

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 2002年 9月28日
Date of Application:

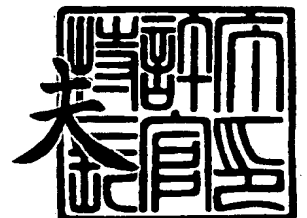
出願番号 特願2002-327516
Application Number:
[ST. 10/C]: [JP 2002-327516]

出願人 猪子 英俊
Applicant(s): 学校法人東海大学

2003年 9月12日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井 康



本証明書には以下のCD-Rが付属している。

ファイル名 : Hai001.txt
 }
 Hai003.txt

ファイルサイズ : 22.7MB

記 録 日 : 2003年9月3日



【書類名】 特許願

【整理番号】 0704001001

【提出日】 平成14年 9月28日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/09

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市泉区緑園一丁目 1 9 番 3 5 号

【氏名】 猪子 英俊

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県伊勢原市下糟屋 2 2 3 5 - 2 メゾンアルタイ
ル 1 0 2

【氏名】 田宮 元

【特許出願人】

【識別番号】 599171235

【氏名又は名称】 猪子 英俊

【特許出願人】

【識別番号】 000125369

【氏名又は名称】 学校法人 東海大学

【代理人】

【識別番号】 100097456

【弁理士】

【氏名又は名称】 石川 徹

【代理人】

【識別番号】 100102923

【弁理士】

【氏名又は名称】 加藤 雄二

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 094216

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 マイクロサテライト遺伝多型マーカーを用いる遺伝子のマッピング方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 スクリーニング対象者群及びコントロール対象者群からDNA試料を採取する工程；

ヒトゲノム上に、50Kb～150Kbの間隔で設定されたマイクロサテライト遺伝多型マーカー含有DNA配列群の各DNA配列に対応する、フォワードプライマー及びリバースプライマーを用い、得られたDNA配列試料でポリメラーゼ連鎖反応を行ない、マイクロサテライト遺伝多型マーカー含有DNA配列断片群を得る工程；スクリーニング対象者群及びコントロール対象者群から得られた該DNA配列断片群を、連鎖不均衡に基づき統計学的に比較し、疾患原因遺伝子又は遺伝的要因を持つヒト表現型の関連遺伝子の存在領域を特定する工程を含む、遺伝子のマッピング方法。

【請求項 2】 さらに、該ポリメラーゼ連鎖反応を行なう前に、それぞれの群から得られたDNA試料を、各群毎に混合してプール化DNA試料を作成する工程を有する、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】 設定されたマイクロサテライト遺伝多型マーカー含有DNA配列群が、配列番号 1～配列番号 27088 の塩基配列からなるDNA配列群の全部、又は一部のDNA配列群である、請求項 1 又は 2 記載の方法。

【請求項 4】 該フォワードプライマーが、長さ15～100塩基で、設定されたマイクロサテライト遺伝多型マーカー含有DNA配列の5末端部から3方向に延びる配列と同じ塩基配列を有するプライマーである、請求項 1 又は 2 記載の方法。

【請求項 5】 該リバースプライマーが、長さ15～100塩基であって、設定されたマイクロサテライト遺伝多型マーカー含有DNA配列の3末端部から5方向に延びる配列と相補的な塩基配列を有するプライマーである、請求項 1 又は 2 記載の方法。

【請求項 6】 該フォワードプライマーが、長さ15～100塩基で、配列番号 1～配列番号 27088 で示される各DNA配列の5末端部から3方向に延びる配列

と同じ塩基配列を有するプライマーである、請求項3記載の方法。

【請求項7】 該リバースプライマーが、長さ15～100塩基で、配列番号1～配列番号27088で示されるDNA配列の3末端部から5方向に延びる配列と相補的な塩基配列を有するプライマーである、請求項3記載の方法。

【請求項8】 マイクロサテライト遺伝多型マーカの解析を、DNAチップ及び質量分析計を用いて行なう、請求項1又は2記載の方法。

【請求項9】 請求項1又は2記載の方法で陽性を示したマイクロサテライト遺伝多型マーカ含有DNA配列群に対し、異なるスクリーニング対象者群及びコントロール対象者群から得たDNA試料を用いて、請求項1又は2の方法により2次スクリーニングを行なう、遺伝子のマッピング方法。

【請求項10】 請求項9記載の方法で陽性を示したマイクロサテライト遺伝多型マーカ含有DNA配列群に対し、解析対象の疾患原因遺伝子又は遺伝的要因を持つヒト表現型の関連遺伝子を有する血縁集団から得たDNA試料を用いて、個別に遺伝子解析を行ない、真の陽性を示すマイクロサテライト遺伝多型マーカ含有DNA配列の存在領域を特定する、遺伝子のマッピング方法。

【請求項11】 請求項1、2、9又は10のいずれか1項記載の方法で特定した、疾患原因遺伝子又は遺伝的要因を持つヒト表現型の関連遺伝子の存在候補領域を、単一ヌクレオチド多型により解析する、遺伝子のマッピング方法。

【請求項12】 ヒトゲノム上に、50Kb～150Kbの間隔で設定したマイクロサテライト遺伝多型マーカ含有DNA配列群の各DNA配列の塩基配列及び位置を示す、マイクロサテライト遺伝多型マーカ含有DNA配列の分布地図。

【請求項13】 ヒトゲノム上におけるマイクロサテライト遺伝多型マーカ含有DNA配列群が、配列番号1～配列番号27088で示される塩基配列からなるDNA配列群である、請求項12記載の分布地図。

【請求項14】 請求項11の方法で特定された遺伝子がコードするタンパク質。

【請求項15】 請求項14記載のタンパク質に対する抗体。

【請求項16】 長さ15～100塩基で、配列番号1～配列番号27088で示される塩基配列の5末端部から3方向に延びる配列と同じ塩基配列を有する

フォワードプライマー。

【請求項 17】 長さ 15～100 塩基で、配列番号 1～配列番号 2708 8 で示される塩基配列の 3 末端部から 5 方向に延びる配列と相補的な塩基配列を有するリバースプライマー。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、マイクロサテライト遺伝多型マーカを用いる遺伝子のマッピング方法に関するものである。特に、本発明は、ヒトゲノム上に設定した、マイクロサテライト遺伝多型マーカ含有 DNA 配列群の各 DNA 配列の塩基配列及び位置を示す分布地図を用いる、遺伝子のマッピング方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

これまで疾患原因遺伝子、又は特定の遺伝子表現型を発現する遺伝子のマッピングを行なう場合、スクリーニング対象者群とコントロール対象者群の遺伝多型マーカを比較し、特定の対立遺伝子の頻度に差異があるかどうかを調べるという方法が取られてきた。

この遺伝多型マーカとして、ゲノムの制限断片長多型 (RFLP; restriction fragment length polymorphism)、ヒトゲノム中に散在する繰り返し配列である VNTR (variable number of tandem repeats)、マイクロサテライト、及び単一ヌクレオチド多型 (SNPs; single nucleotide polymorphisms) などがあり、特に SNP とマイクロサテライトの利用が注目されてきた。

【0003】

しかし、遺伝多型マーカとして SNPs を用いる場合、次のような問題があった。すなわち、SNPs は、ゲノム上の一塩基置換であり、対立遺伝子数は一般に 2 個のみで、マッピングすべき遺伝子から 5kb 以内～10kb 以内に存在する一部の SNPs しか相関を示さない為、SNPs を遺伝多型マーカとしてゲノムマッピングを行う場合には、膨大な数の SNPs をマーカとして設定して、解析する必要がある。

一方、マイクロサテライトの遺伝多型マーカは対立遺伝子数が多く、マッピング

すべき遺伝子からある程度離れた位置にあっても相関を示すという特徴があるが、該遺伝多型マーカの設定数が多すぎると時間及び労力の点で解析が困難であり、設定数が少なすぎると相関が検出されず、原因遺伝子を見落とすという問題があった。

【0004】

さらに、近年、集団での遺伝子多型情報を収集・比較し、個人の表現形質を規定する遺伝的メカニズムを解明しようとする流れを受け、多因子性の遺伝性疾患又は表現型についても、感受性遺伝子の検索が開始されているが、これまでのマイクロサテライト、又はSNPsを利用する方法では、ヒトゲノム上の限られた領域や遺伝子のみを対象とすることしかできず、また、全染色体を対象とする場合にも解像度の低い方法しか用いることができなかった。そのために感受性遺伝子の同定ができないか、またできたとしても他の遺伝子が関与する可能性を排除できない場合が多かった。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、これまで説明したSNPsやマイクロサテライトを利用した遺伝子マッピング方法の欠点がなく、かつ集団での遺伝子多型情報を収集・比較し、個人の表現形質を規定する遺伝的メカニズムを解明できるゲノムワイドな多様性解析方法を提供することである。

さらに、本発明の目的は、該ゲノムワイドな多様性解析方法によって見出された遺伝子がコードする有用なタンパク質、及び該タンパク質に対する抗体を提供することである。

【0006】

【課題を解決するための手段】

前記課題を解決するために、本発明は、遺伝子マッピング方法であって、スクリーニング対象者群及びコントロール対象者群からDNA試料を採取する工程；ヒトゲノム上に、50Kb～150Kbの間隔で設定されたマイクロサテライト遺伝多型マーカ含有DNA配列群の各DNA配列に対応する、フォワードプライマー及びリバースプライマーを用い、得られたDNA配列試料でポリメラーゼ連鎖反応を行な

い、マイクロサテライト遺伝多型マーカ含有DNA配列断片群を得る工程；スクリーニング対象者群及びコントロール対象者群から得られた該DNA配列断片群を、連鎖不均衡に基づき統計学的に比較し、疾患原因遺伝子又は遺伝的要因を持つヒト表現型の関連遺伝子の存在領域を特定する工程を含む、該遺伝子のマッピング方法を提供する。

【0007】

また、本発明は、長さ15～100塩基で、ヒトゲノム上に設定されたマイクロサテライト遺伝多型マーカ含有DNA配列の5末端部から3方向に延びる配列と同じ塩基配列を有するフォワードプライマーを提供する。

また、本発明は、長さ15～100塩基であって、設定されたマイクロサテライト遺伝多型マーカ含有DNA配列の3末端部から5方向に延びる配列と相補的な塩基配列を有するリバースプライマーを提供する。

さらに、本発明は、ヒトゲノム上に、50Kb～150Kbの間隔で設定したマイクロサテライト遺伝多型マーカ含有DNA配列群の各DNA配列の塩基配列及び位置を示す、マイクロサテライト遺伝多型マーカ含有DNA配列の分布地図を提供する。

【0008】

〔定義、用語の略語及び用語の説明〕

本明細書中の用語「フォワードプライマー」とは、ヒトゲノム上に設定されたマイクロサテライト遺伝多型マーカ含有DNA配列の5末端部から3方向に延びる配列と同じ塩基配列を有するプライマーをいう。

本明細書中の用語「リバースプライマー」とは、ヒトゲノム上に設定されたマイクロサテライト遺伝多型マーカ含有DNA配列の3末端部から5方向に延びる配列と相補的な塩基配列を有するプライマーをいう。

本明細書中の用語「分布地図」とは、ヒトゲノム上に、所望の間隔で設定したマイクロサテライト遺伝多型マーカ含有DNA配列群の各DNA配列の塩基配列及び位置を示す、マイクロサテライト遺伝多型マーカ含有DNA配列の分布を示す地図をいう。本明細書では、該遺伝多型マーカ含有DNA配列群として、配列番号1～配列番号27088で示される塩基配列からなるDNA配列群を記載している。

【0009】

なお、配列番号1～配列番号27088で示される塩基配列は、それぞれ次のヒト染色体上にある。染色体の右の数字は配列番号である。

第1常染色体	1～2203
第2常染色体	2204～4561
第3常染色体	4562～6438
第4常染色体	6439～8005
第5常染色体	8006～9641
第6常染色体	9642～11422

【0010】

第7常染色体	11423～13352
第8常染色体	13353～14629
第9常染色体	14630～15734
第10常染色体	15735～17011
第11常染色体	17012～18202
第12常染色体	18203～19560
第13常染色体	19561～20427
第14常染色体	20428～21178
第15常染色体	21179～21732
第16常染色体	21733～22478

【0011】

第17常染色体	22479～23137
第18常染色体	23138～23801
第19常染色体	23802～24313
第20常染色体	24314～24953
第21常染色体	24954～25307
第22常染色体	25308～25634
X染色体	25635～26697
Y染色体	26698～26801

位置未特定 26802~27088

【0012】

本明細書中で用いる略語「MS遺伝多型マーカ配列」、又は「MSマーカ配列」とは、マイクロサテライト遺伝多型マーカ含有DNA配列を意味する。

本明細書中で用いる略語「MS遺伝多型マーカ配列断片」又は「MSマーカ配列断片」とは、マイクロサテライト遺伝多型マーカ含有DNA配列断片を意味する。

本発明における遺伝多型とは、特定の遺伝子座の対立遺伝子の種類が2種類以上存在し、その頻度が1%以上であることをいう。また遺伝子座とは、ゲノム上のいずれかの領域であればよく、発現される遺伝子領域に限定されない。また、マイクロサテライトとは、2塩基から6塩基が繰り返した配列をいう。ゲノム内には、マイクロサテライトが2~3kbに1個の頻度で存在していることが知られている。それぞれのマイクロサテライトの繰り返しの回数は個人間で異なる場合がある。

【0013】

この繰り返し数のばらつきが、STR(Short Tandem Repeat:短塩基縦列繰り返し配列)と呼ばれる多型を形成している。マイクロサテライトの遺伝多型は、一般にこの繰り返し数により決定される。このようなマイクロサテライトの代表例はCAリピートである(Dib, C. et al., 1996, Nature 380:152-154)。

例えば、本発明者らによるヒトHLA領域のマイクロサテライトの解析によれば、2塩基繰り返しのマイクロサテライトは約8.9kbに1つ、3塩基繰り返しのマイクロサテライトは約12.9kbに1つ、4塩基繰り返しのマイクロサテライトは約6.6kbに1つ、5塩基繰り返しのマイクロサテライトは約12.6kbに1つ、これらのマイクロサテライトを併せると、約2.4kbに1つの割合で見出された (Shiina, T. et al., 1999, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 13282-13287)。

【0014】

本発明においては、これらのマイクロサテライトを適宜選択して、遺伝多型マーカとして使用する。本発明では、ゲノムワイドにマイクロサテライトを選択し、ヒトゲノム上に、50Kb~150Kb、好ましくは80Kb~120Kb、特に好ましくは90Kb~110Kbの間隔で設定したマイクロサテライト遺伝多型マー

カ含有DNA配列群の各DNA配列の塩基配列及び位置を示す、マイクロサテライト遺伝多型マーカー含有DNA配列の分布地図を作成して利用する。

【 0 0 1 5 】

本発明者は、実際にヒトゲノム上におけるマイクロサテライト遺伝多型マーカー含有DNA配列群が、配列番号 1 ～ 配列番号 2 7 0 8 8 で示される塩基配列からなるDNA配列群である分布地図を作成した。該配列番号を記載した配列表には、それぞれDNA配列毎に染色体番号、染色体上位置、前後のDNA配列との距離が示されている。

なお、ここで本願明細書に添付した配列表の（他の情報）「<223>」の日本語訳とその説明をしておく。配列表中、「<223> Marker ID: 」とは、「マーカー特定記号」の意味である。この特定記号は出願人が、それぞれマイクロサテライト遺伝マーカーに付けた識別記号であり、出願人において、発明の実施、及び必要な場合に追試実験データを作成する上で必要なものである。

【 0 0 . 1 6 】

「<223> Located on chromosome 」とは、「染色体上の位置」の意味である。「<223> Located on chromosome 17」と記載されていれば、該当する塩基配列が第 1 7 染色体上にあることを意味する。「<223> Distance between a terminus base of telomere on chromosomal short arm and 5'-terminus of this base sequence : 」とは、「染色体の短腕テロメア側の最末端塩基と、該当する塩基配列の5末端との距離」を意味する。すなわち、「<223> Distance between a terminus base of telomere on chromosomal short arm and 5'-terminus of this base sequence : 72160696」と記載されていれば、該当する塩基配列の5末端と、その染色体の短腕テロメア側の最末端塩基との距離が72160696塩基であることを意味する。

【 0 0 1 7 】

「<223> Distance between 3'-terminus of neighbour sequence of sequence listing upward to telomere on chromosomal short arm and 5'-terminus of this base sequence : 107571」とは、「染色体の短腕テロメア側にある、配列表の隣接する塩基配列の3末端との距離と、該当する配列の5末端との距離」を意味

する。すなわち、「<223> Distance between 3'-terminus of neighbour sequence of sequence listing upward to telomere on chosomal short arm and 5'-terminus of this base sequence : 107571」と記載されていれば、該当する塩基配列の5末端と、短腕テロメア側にある隣の塩基配列（アプリコン）の3末端との距離が107571塩基であることを意味する。なお、この数字が「0」である場合、隣の塩基配列が存在しないことを意味する。

【0 0 1 8】

なお、ゲノム上約100kbに1個の割合で存在するように該MS遺伝多型マーカの設定を行なった。標的遺伝子から100kb～200kb以内に位置するマイクロサテライトが連鎖不平衡を示し、マッピングにより疾患などの表現型との相関が検出され、標的遺伝子の領域を特定することが可能となるからである。つまり、原因遺伝子から100kb～200kb以内に位置するマイクロサテライトの遺伝多型が連鎖不平衡を示すため、原因遺伝子を見落とすことなく確実に相関を検出し、かつ費やす労力を最小に抑える最も効果的な原因遺伝子マッピングを行うために、約100kbに1個の割合でMS遺伝多型マーカを設定した分布地図を作成したのである。

【0 0 1 9】

なお、本発明において「約100kbに1個」の割合という場合、通常、平均で50kb～150kbに1個の割合、好ましくは平均で80kb～120kbに1個の割合、さらに好ましくは平均で90kb～110kbに1個の割合であることを意味する。また、本発明において「約100kbに1個の割合で設定された」とは、MS遺伝多型マーカを設定した領域全体で、約100kbに1個の割合で設定されている場合だけでなく、部分的に約100kbに1個の割合で設定されている場合も含む。例えば、ある領域で約100kbに1個の割合でMS遺伝多型マーカを設定し、別の領域で異なる頻度でマーカーを設定し、全体として「約100kbに1個」の割合に当てはまらなくなる場合でも、ある領域で約100kbに1個の割合でMS遺伝多型マーカを設定してある限り、本発明の「約100kbに1個の割合で設定された」に該当する。

【0 0 2 0】

なお、割合を算出する際、MS遺伝多型マーカが3個以上設定されていれば算出可能であるが、好ましくは5個以上、さらに好ましくは7個以上、さらに好まし

くは10個以上で算定する。

また、遺伝子マッピングに用いるMS遺伝多型マーカの分布地図を作成する場合、設定するMS遺伝多型マーカは、解析における情報量が高いものが好ましい。例えば、対立遺伝子数(アレル数)が多いほど、またヘテロ接合度(heterozygosity)が高いほど、解析における情報量は高くなる。

【0021】

本発明において「対立遺伝子数」とは、ある遺伝子の対立遺伝子の数である。すなわち、ある遺伝子座の塩基配列が異なるゲノム配列を互いに「対立遺伝子」の関係にあるといい、遺伝子型に相当するものであり、その数を対立遺伝子数という。「対立遺伝子数の平均」は、本発明のマッピング方法で用いるマイクロサテライト全てについての対立遺伝子数の平均である。例えば、1～n番目のマイクロサテライトの対立遺伝子数を、それぞれ $m_1 \sim m_n$ とすると、1～n番目までのn個のマイクロサテライトについての対立遺伝子数の平均は次式で表される：

$$\text{対立遺伝子数の平均: } (m_1 + m_2 + m_3 + \dots + m_n) / n$$

また、「ヘテロ接合性」とは、ヒトのような2倍体の生物において、2本の染色体が遺伝子の対立遺伝子が異なる状態をいい、「ヘテロ接合度」はヘテロ接合性の度合いを表す。X番目のマイクロサテライトの対立遺伝子数が m_x であり、各対立遺伝子の頻度をそれぞれ $F_{m_1} \sim F_{m_x}$ とすると、そのマイクロサテライトの「ヘテロ接合度(h_x)」は、下記式で表される。

【0022】

$$h_x = 1 - (F_{m_1}^2 + F_{m_2}^2 + F_{m_3}^2 + \dots + F_{m_x}^2)$$

そして、n個のマイクロサテライトの「ヘテロ接合度の平均」は、次式で表される。

$$\text{ヘテロ接合度の平均: } (h_1 + h_2 + h_3 + \dots + h_n) / n$$

対立遺伝子数の平均が5個以上、好ましくは8個以上であり、かつヘテロ接合度の平均が60%以上、好ましくは65%以上、さらに好ましくは70%以上である遺伝多型マーカを用いることで、より効率的なマッピングが可能になる。

【0023】

本発明の遺伝子マッピングは、通常、コントロール群となる健常者と無作為に

選んだ疾患患者のMS遺伝多型マーカの頻度を比較することにより行う。すなわち、コントロール群の健常者のマイクロサテライトの各対立遺伝子の頻度と、無作為に選んだ疾患患者のマイクロサテライトの各対立遺伝子の頻度を、相関解析で比較する。ここでいう「無作為に選ぶ」とは、患者同士が血縁関係(兄弟又は親子)であることを条件としないことをいう。好ましくは患者間に血縁関係(兄弟又は親子)がない患者集団である。もし、マイクロサテライトが疾患原因遺伝子から100~200kb以内であれば、健常者と疾患患者との間で、そのマイクロサテライトの各対立遺伝子の頻度が統計的に異なる。相関解析は、公知の方法に従って行うことができる(西村泰治:多型の統計学的利用法、最新医学46: 909-923, 1991; Oka・A. et al., Hum. Mol. Genetics 8: 2165-2170 (1999); Ota, M. et al., Am. J. Hum. Genet. 64: 1406-1410 (1999; Ozawa, A. et al. Tissue Antigens 53:263-268(1999))。

【0024】

また、疾患に限らず任意の遺伝要因を持つ表現型に対しても、例えば、目的とする表現型を持つ個体とコントロール群の個体を無作為に選び、その間のMS遺伝多型マーカの頻度を比較することにより、その表現型に関与する原因遺伝子のマッピングを行うことができる。

〔マッピングの標的遺伝子〕

本発明でマッピングの対象となる標的遺伝子は、特に制限する必要はなく、すべての疾患原因遺伝子、及び遺伝的な要因を持つヒト表現型の関連遺伝子である。

遺伝子に関与する疾患、又は関与が疑われる疾患には、単一の遺伝子の異常により発症する単一遺伝子疾患(monogenic diseases)、及び複数の遺伝子が相加的に、及び／又はさらに環境因子が加わって発症する多遺伝子性疾患(polygenic diseases)が含まれる。すなわち、本発明において疾患原因遺伝子には、その遺伝子が単独で該疾患の原因となっているもののみならず、複数の遺伝子や環境要因などと共に該疾患の発症や進展に関与している遺伝子が含まれる。また、本発明において疾患原因遺伝子には、ある疾患に対する治療において薬剤感受性を規定している遺伝子も含まれる。

【0025】

該多遺伝子性疾患には、いわゆる「ありふれた病気(common diseases)」に代表される、例えば、糖尿病、高血圧、慢性関節リウマチ、痛風、高脂血症、動脈硬化、精神分裂病、癌、心疾患、脳梗塞、無精子病などがあり、大部分の生活習慣病が含まれる。さらに、自閉症、躁鬱病、てんかんなども含まれ得る。本発明のマッピングにより、疾患の原因遺伝子(群)の特定とその分子機構を解明することができ、該疾患の診断、創薬、予防法の開発への応用が期待される。

【0026】

また、本発明の遺伝的な要因を持つヒト表現型の関連遺伝子とは、例えば、身長、体重、美肌、肌色、髪色、知能、記憶、性格等に関与する原因遺伝子を含み、本発明は該遺伝子のマッピングにも適用することができる。従って、検出可能な表現型を示す遺伝子は、本発明における標的遺伝子となる。また、本発明の遺伝子マッピング方法は、ヒトだけに限定されず、哺乳類、鳥類等を含む全ての動物に適用することができる。次に、本発明の実施例でマッピングの対象とした尋常性乾癬及び慢性関節リウマチ(RA)について説明する。

【0027】

〔尋常性乾癬〕

尋常性乾癬(psoriasis vulgaris;MIM 177900)は、炎症性細胞浸潤と表皮細胞の過剰増殖とを特徴とする頻度の高い皮膚疾患である。白人人口の2%近くが本症に罹患するが、本症に家族性発症の性質があることは以前から知られている。しかし、日本人での発生率はこれよりも低く(0.1%)、尋常性乾癬の症例の大部分は散発性である。以上の事実は、尋常性乾癬が多因子疾患であり、特定の遺伝的背景をもつ個人に何らかの環境因子が加わることによって誘発されることを明確に示している。事実、ゲノム全体に及ぶ連鎖研究により、染色体6p21.3[ヒト白血球抗原(HLA)]、17q25、及び4q、並びに他の数多くの部位で感受性遺伝子座がいくつか同定されている(Tomfohrde. J. et al. (1994) Science, 20, 1141-1145; Mathews, D. et al. (1996) Nature Genet., 14, 231-233; Nair, R.P. et al. (1997) Hum. Mol. Genet., 6, 1349-1356; Trembath, R.C. et al. (1997) Hum. Mol. Genet., 6, 813-820)。

【0028】

中でも、HLA遺伝子座は本症の素因となる主要な遺伝因子の一つであると考えられている。尋常性乾癬はHLA-B13、-B17、-B39、-B57、-Cw6、及び-Cw7といった血清学的に定義されたいくつかのHLAクラスI抗原と相関することがよく知られている。このことは白色人種および日本人を含む世界中の多くの集団で確認されている(Brenner, W. et al. (1978) Arch. Dermatol. Res., 28, 337-339; Tiilikainen, A. et al. (1980) Br. J. Dermatol., 102, 179-184; Ozawa, A. et al. (1981) J. Am. Acad. Dermatol., 4, 205-230; Cao, K. et al. (1993) Chin. Med. J., 106, 132-135; Schmitt-Egenolf, M. et al. (1996) J. Invest. Dermatol., 106, 711-714)。

【0029】

以上のアレルのうち、最も一貫して著明な相関が認められるものがHLA-Cw6である。しかし、この相関は、HLA-B27と強直性脊椎炎(MIM 106300)との相関(この場合にはこのアレルを100%に匹敵する患者が有するため真の原因である可能性が高い)ほど強くはない(Moller, E. and Olhagen, B. (1975) Tissue Antigens, 6, 237-246)。実際には、HLA-Cw6アレルを有する尋常性乾癬患者はわずか10%(日本人)から45%(白色人種)に過ぎない(Tiilikainen), A. et al. (1980) Br. J. Dermatol., 102, 179-184; Asahina, A. et al. (1991) J. Invest. Dermatol., 97, 254-258)。このため、HLA-C遺伝子自体が尋常性乾癬の原因となる主要な遺伝子座ではなく、付近に位置する他の遺伝子(群)に真の病原性変異／アレルが存在してHLA-Cw6と強い連鎖不平衡を示すという可能性も考えられる。この点に関しては、HLA-C遺伝子の周囲に位置する高分解能遺伝マーカーを用いて、感受性遺伝子座と推定されるこの部分の詳細なマッピングを行う必要がある。

【0030】

本発明者らは、MICB(主要組織適合遺伝子複合体クラスI鎖関連遺伝子B)からHLA-A-Fまでの1.8MbのHLAクラスI領域全体の配列解析を完了し、40種を上回る新たな遺伝子をこの区域内で同定した(Mizuki, N. et al. (1997) Genomics, 42, 55-66; Shina, T. et al. (1998) Genomics, 47, 372-382; Shina, T. et al. (1999

) Immunol. Rev., 167, 193-199)。そこで、本発明者は、主要組織適合遺伝子複合体(MHC)と連鎖した「乾癬遺伝子」と推定される遺伝子の日本人の尋常性乾癬患者における高分解能マッピングを行うために、この断片に対象を絞って、HLA-C遺伝子座周囲の1060kb区域の全体にわたって一定間隔で存在する合計11種の多型性に富む新規MS遺伝多型マーカーを選択し、その相関分析を行った。これは、96.7kbに1個の密度でMS遺伝多型マーカーを配置したと見積られるものである。

【0031】

これらのMS遺伝多型マーカーを用いて、各マイクロサテライト座でのアレル頻度の分布及びハーデーワインベルグ平衡からの偏差に関する統計解析を行った。その結果、尋常性乾癬に関する病原性遺伝子がHLA-C遺伝子のテロメア側89~200kbにわたる111kbの狭い区間内に位置することを特定するに至った。ケラチノサイトmRNAを用いたRT-PCR解析によれば、尋常性乾癬に関して規定されたこの重要な領域内には、これまでにPOU5F1(OTF3;オクタマー転写因子3) (Takeda, J. et al. (1991) Nucleic Acids Res., 20, 4613-4620; Krishnan, B.R. et al. (1995) Genomics, 30, 53-58)、TCF19(SC1:細胞増殖調節性遺伝) (Krishnan, B.R. et al. (1995) Genomics, 30, 53-58; Ku, D.H. et al. (1991) Cell Growth Differ., 2, 179-186)及びS(コルネオデスモシン遺伝子) (Zhou, Y. and Chaplin, D.D. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 9470-9474; Ishihara, M. et al. (1996) Tissue Antigens, 48, 182-186; Tazi Ahni ni, R. et al. (1999) Hum. Mol. Genet., 8, 1135-1140; Allen, M. H. et al. (1999) Lancet, 353, 1599-1590)という既知の3つの遺伝子に加えて、HLAクラスI領域全体のゲノムシーケンシングを通じて同定された4つの新たな発現型遺伝子、すなわちHCR(helix coiled-coil rod homologue)、SPR1(Skin specific proline rich gene 1)、SEEK1(specific expressed gene in epidermal Keratinocytes 1)、及びSTG(skin specific telomeric gene) (AB029331、AB031480、AB031479、及びAB031481)を含む。これにより、尋常性乾癬に対する感受性に関与する7つの遺伝子が特定される。

【0032】

中でもS遺伝子は、分化中の表皮ケラチノサイトで発現される52~56kDa蛋白質

であるコルネオデスモシンをコードすることから、明らかに尋常性乾癬に関与する候補である。また、尋常性乾癬に関する11kbの重要な領域に位置する4つの新規遺伝子のうち1つは、ケラチノサイトをはじめとして検討した組織の大部分で発現しており、 α ヘリックス性コイルドコイルロッドドメインを有するプレクチン様蛋白質をコードする。プレクチンは細胞骨格の架橋成分として働くことによって細胞及び組織に機械的強度を与えたとの仮説が提唱されている(Liu, C.G. et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 30, 4278-4283)。さらに、プレクチン遺伝子が単純型先天性表皮水疱症の発生の原因となることは特に興味深い(Pulkkinen, L. et al. (1996) Hum. Mol. Genet., 5, 1539-1546)。これ以外の3つの新規遺伝子はDNAデータベース中の既知の遺伝子のいずれとも相同性がなかったが、そのすべてがケラチノサイト及び皮膚組織で特異的に発現されることは注目値する。このため、S遺伝子に加えて、以上の4つの新規遺伝子も、発現パターン及び／又は予想される機能の点からみて尋常性乾癬の特に有力な候補遺伝子である。このように、本発明者は、本発明のMS遺伝多型マーカ含有DNA配列群を使用することにより、遺伝子のマッピングを効率よく行うことが可能であることを実証している。

【0033】

〔慢性関節リウマチ (RA) 〕

慢性関節リウマチ (RA; rheumatoid arthritis) は、関節滑膜細胞の増殖、関節、軟骨、骨の破壊を伴う進行性の慢性炎症性疾患で、全身性エリテマトーデスと共に代表的な全身性自己免疫疾患である。全人口に占めるRA患者の割合は、世界中で0.5~1.0%程度であり、日本では70~100万人程度の患者数が想定されている。北アメリカ先住民族 (Native American) のように顕著に高い罹患率を示す民族や、逆にナイジェリア人のように例外的に罹患率が低い特殊な民族は存在するが、診断基準の違い等を考慮すると一般的には人種による発症頻度差は小さいと考えられる。

【0034】

RA発症率は年齢と共に増加し、逆に60歳を超えると減少する。特に女性の場合には男性よりも発症頻度が2~3倍高く、年齢層では30~50歳で好発する傾向が認

められる。しかし、RA発症は明確に性に連鎖するものではなく、このような性差は男性においてRA発症に対する何らかの抵抗反応が働いていることに起因すると考えられており、その一つとして男性ホルモン（アンドロゲン）の影響が指摘されている。このように、女性ではRA発症に至るまでの危険因子蓄積の閾値が、男性よりも低いと考えられる。

【0035】

RAの病態に関しては、分子生物学的手法の進歩によりサイトカインカスケード等の免疫学的側面をはじめとした理解が飛躍的に進んだが、根源的な病因に関しては、いくつかの状況証拠が得られてはいるものの未だ直接に全体像を解明するには至っていない。しかし、RAには遺伝性が存在することがこれまでの疫学データから示唆されている。一つは、家系内集積性、もう一つは、一卵性双生児における発症の一致率である。

【0036】

疾患が遺伝性を持つならば、疾患を遺伝する家系内での発症率は、集団全体での発症率よりも高くなると予想される。

RAにおける家系内発症率は8%程度であり、一般集団における発症率が約1%であることから、家系内集積性を図る指標である λ R値（＝家系内発症率／一般集団での有病率）はおよそ8であると推定される。つまり、一般集団と比較すると家系内での発症率が8倍程度高いことを意味しており、これによってRA発症には遺伝的要因が関与することが示唆されている。また、対象とする疾患に遺伝性がない場合、一卵性双生児と二卵性双生児における各ペアでの発症一致率（双生児が共に罹患する率）はほぼ同程度の低い値になるが、遺伝性が強まるほど両双生児における一致率が高くなり、特に一卵性双生児における一致率が高くなる。

【0037】

これまで、AhoらやSimlmanらにより、一卵性双生児での発症一致率が二卵性双生児よりも4倍程度高いことが報告されており、遺伝的要因の関与を示唆するものである。また一方では、二卵性双生児において発症一致率が急速に低下することから、原因となる遺伝的要因、すなわちRA感受性遺伝子は染色体上に複数存在するとの予想もなされている。

このように遺伝的要因の関与が強く示唆されている慢性関節リウマチの感受性遺伝子を同定する第一段階として、まず、本発明の方法によりゲノムワイドに遺伝的相関解析を行い原因遺伝子の存在する候補領域を絞った。

【0038】

【発明の実施の形態】

本発明におけるMS遺伝多型の検出は、例えば、ヒトゲノム上に、所望の間隔で設定されたマイクロサテライト遺伝多型マーカ含有DNA配列群の各DNA配列に対応する、フォワードプライマー及びリバースプライマーを用い、該DNA配列試料をポリメラーゼ連鎖反応（PCR）で増幅し、DNAシーケンサーなどの分解能が高いゲルで電気泳動を行い、増幅産物であるマイクロサテライト遺伝多型マーカ含有DNA配列断片を測定、解析することにより行うことができる。

【0039】

本発明では、検出に先立ち、前もってヒトゲノム上に、所定の間隔で設定したマイクロサテライト遺伝多型マーカ含有DNA配列群の各DNA配列の塩基配列及び位置を示す、マイクロサテライト遺伝多型マーカ含有DNA配列の分布地図を作成して利用する。本発明者は、実際にヒト全ゲノム上におけるマイクロサテライト遺伝多型マーカ含有DNA配列群を設定し、配列番号1～配列番号27088で示される塩基配列の全部又は一部からなるDNA配列群を含む分布地図を作成して利用した。該分布地図を利用することにより、本発明ではゲノムワイドな遺伝子マッピングが可能になった。なお、該分布地図の作成に用いたヒトゲノム参照配列として、Golden Path (Dec. 22, 2001) (<http://genome.ucsc.edu/>)を用いた。

【0040】

本発明におけるフォワードプライマーとは、長さ15～100塩基、好ましくは15～25塩基、さらに好ましくは18～22塩基であり、ヒトゲノム上に設定されたマイクロサテライト遺伝多型マーカ含有DNA配列の5末端部から3方向に延びる配列と同じ塩基配列を有するプライマーをいう。

該リバースプライマーとは、長さ15～100塩基、好ましくは15～25塩基、さらに好ましくは18～22塩基であり、ヒトゲノム上に設定されたマイクロサテライト遺伝多型マーカ含有DNA配列の3末端部から5方向に延びる配列と相

補的な塩基配列を有するプライマーをいう。

【 0 0 4 1 】

本発明の方法は、DNAチップと質量分析法を用いてをより簡便に実施することができる。例えば、チップ上に1000個以上のMS遺伝多型マーカDNA配列をスポットし、レーザー光を照射してイオン化させ、真空管を飛行する距離を指標にして分子量を測定することにより、マイクロサテライトの繰り返し数、すなわち多型を容易に、かつ短時間に測定することが可能である(Braun, A. et al., Genomics 46: 18-23(1997))。具体的には、例えば、DNA MassArray (登録商標) (MSチップ) (Sequenom Co. LTD, San Diego, CA, USA; PE Biosystems Co. LTD, (現Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)を利用することができる。

【 0 0 4 2 】

また、ゲノムワイドに設定したMS遺伝多型マーカに対応するフォワードプライマーとリバースプライマーを使用して、本発明の方法により1次スクリーニングを行い、該1次スクリーニングによって陽性を示したMS遺伝多型マーカ対して2次スクリーニングを行うことができる。2次スクリーニングでは異なったサンプル集団を用い、1次スクリーニングと同様に解析する。この2次スクリーニングによる追試工程の結果、偽陽性を示すMS遺伝多型マーカを無理な補正無しに劇的に減らすことが出来る。

【 0 0 4 3 】

本発明のMS遺伝多型マーカを用いるマッピングにより標的遺伝子の位置が絞り込まれたら、これを別の遺伝子マッピング法により、さらに候補位置を絞り込み、又は遺伝子座を特定することができる。このためには、例えば、SNPsを用いる解析が有効である。SNPはゲノム上で300～500塩基対に1つの割合で存在し、MS遺伝多型マーカの数百倍の出現頻度を示すため、本発明のマッピング方法に続いてSNP解析を適用することで標的遺伝子の特定ができるであろう。具体的には、MS遺伝多型マーカで解析を行った後、標的遺伝子が存在すると思われる候補領域のSNPの多型頻度を、例えば、相関解析などにより患者集団と健常者集団等で比較し、ハプロタイプ解析により検出された連鎖不平衡にあるSNPマーカを連鎖不平衡解析を通して検出する。

【0044】

ここで、本発明のMS遺伝多型マーカーを利用したマッピング方法の利点の理解を図るため、ヒトゲノムのSNPs（単一ヌクレオチド多型）解析について説明する。SNPs解析は、遺伝子内の一塩基置換、欠失、挿入による差異にもとづく多型をゲノムワイドに30万個ほど収集し、これを遺伝多型マーカーとして疾患の原因遺伝子などをマッピングする方法である。

その背景は、いわゆる生活習慣病をはじめとする多因子性疾患は、SNP多型によることが考えられるからである。しかしながら、SNPは一般的には、対立遺伝子の数が2個のみであることから、マッピング能力が低い(Kruglyak, L., *Nature Genetics* 17:21-24, 1999)。実際、本発明者の解析によると、対立遺伝子の数が5個以上のマイクロサテライトは、標的遺伝子から約200kb以内に位置するマイクロサテライト全てが有意な相関を示したが、一方、SNPs解析では、標的遺伝子の約5kb以内という非常に密接したSNPsの、しかもそれらの一部のみしか有意な相関を示さないことが判明した。

【0045】

その理由は先述のように、SNPの対立遺伝子(allele)の数が一般的には2個のみであり、ヘテロ接合度が50%以下(通常17%)と、SNPのマッピングの能力が低いためと考えられる。従って、ゲノムマッピングで最も有効な戦略は、本発明の方法に従い、まずゲノムワイドなMS遺伝多型マーカー約30,000個を記載した分布地図(約100kbに一個の密度)を利用して、マッピング行い、標的遺伝子候補領域を100kbに絞り込んだのち、SNP解析を行って、標的遺伝子を同定することであると考えられる。

【0046】

また、決定された配列から標的遺伝子を特定するには、例えば、GRAIL (Uebacher, E.G. and Mural, R. J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 11261-5 (1991))、又はGENSCAN (Burge, C. and Karlin, S., *J. Mol. Biol.* 268:78-94(1997))などのコンピュータプログラムを用いて発現している可能性のあるエクソン領域を予測したり、繰り返し配列を除いた塩基配列をEST(expressed sequence tag)データベースに対して相同性検索を行うことによって予測することができ

る。

【0047】

これらの結果を基に、PCRプライマーやプローブを作成し、RT-PCRやノーザンハイブリダイゼーションにより、細胞内で発現される断片を特定する。発現断片が得られれば、さらに、5RACE及び3RACE等によりcDNA全長を得ることが可能である。または、遺伝子断片をプローブとしたcDNAライブラリーのスクリーニング、CapSiteライブラリーのスクリーニングなどによりcDNAを単離することもできる。

本発明者らはこれまでに、ヒト白血球抗原(HLA)遺伝子座の大規模な配列解析を通して、多数の遺伝子と共に、マッピングに用いることが可能なマイクロサテライトを同定している(Mizuki, N. et al. (1997) Genomics, 42, 55-66; Shiina, T. et al. (1998) Genomics, 47, 372-382; Shiina, T. et al. (1999) Immunol. Rev., 167, 193-199)。そして、本発明の分布地図を用いて、ゲノムワイドな遺伝子マッピングを行う、一次スクリーニングにより、同様な結果を得ることができる。さらに本発明の遺伝子マッピング方法を、このHLA領域に絞り込んで適用することができる。

【0048】

本発明において「HLA領域」とは、セントロメアHSET遺伝子から、テロメア側HLA-F遺伝子までの3.6Mb領域である。HLA領域には、これまで述べた乾癬以外にも、様々な疾患に関連する原因遺伝子が存在すると予想される。

本発明の遺伝子マッピング方法をこのHLA領域に対して適用することにより、これら疾患の原因遺伝子のマッピングを効率的に行うことが可能である。HLA領域に原因遺伝子が存在することが予想される具体的な疾患としては、乾癬以外に、例えば、リウマチ、パーチェット病、若年性糖尿病、バセドウ病、心筋症、びまん性汎細気管支炎、バージャー病、高安病、ナルコレプシー、サルコイドーシス、原田病、重症性筋無力症、多発性硬化症などが挙げられる。

【0049】

本発明のマッピング方法を利用して特定した疾患等の原因遺伝子は、該疾患の検査、疾患の予防及び治療に利用することが可能である。また、疾患以外の表現

型に関与する遺伝子も、遺伝子診断などの検査や遺伝子治療などへ利用することが可能である。該特定された遺伝子のクローニングは、当業者に公知の方法により行うことができる。例えば、該遺伝子が発現している細胞よりcDNAライブラリーを作製し、マッピングにより同定された遺伝子断片をプローブにしてハイブリダイゼーションを行うことにより調製できる。cDNAライブラリーは、例えば、文献(Sambrook, J. et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989))に記載の方法により調製してもよいし、市販のDNAライブラリーを用いてもよい。また、該遺伝子が発現している細胞よりRNAを調製し、逆転写酵素によりcDNAを合成した後、遺伝子配列(又は断片)に基づいてオリゴDNAを合成し、これをプライマーとして用いてPCR反応を行いcDNAを増幅させることにより調製することも可能である。

【0050】

標的遺伝子全長の塩基配列を決定することにより、それがコードする翻訳領域を決定でき、該遺伝子がコードする蛋白質のアミノ酸配列を得ることができる。また、得られたcDNAをプローブとしてゲノムDNAライブラリーをスクリーニングすることにより、ゲノムDNAを単離することができる。

本発明において遺伝子とは、cDNA及びゲノムDNAが含まれる。ゲノムDNAには、遺伝子のエクソン、イントロン、プロモーター及びエンハンサーが含まれる。また、対立遺伝子及びバリエーションが含まれる。

【0051】

本発明の方法を用いて特定された標的遺伝子のクローニングは、例えば、下記の手順で行なうことができる。まず、該遺伝子が発現している細胞、組織、臓器からmRNAを単離する。mRNAの単離は、公知の方法、例えば、グアニジン超遠心法(Chirgwin, J.M. et al. Biochemistry (1979) 18, 5294-5299)、AGPC法(Chomczynski, P. and Sacchi, N., Anal. Biochem. (1987) 162, 156-159)等により全RNAを調製し、mRNA Purification Kit (Pharmacia社)等を使用して全RNAからmRNAを精製する。また、QuickPrep mRNA Purification Kit(Pharmacia社)を用いることによりmRNAを直接調製することもできる。

【0052】

得られたmRNAから逆転写酵素を用いてcDNAを合成する。cDNAの合成は、AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit. (生化学工業)等を用いて行うこともできる。また、標的遺伝子の部分配列をプライマーに用いて、5A mpli FINDER RACE Kit (Clontech社製)及びポリメラーゼ連鎖反応(polymerase chain reaction; PCR)を用いた5' -RACE法(Frohman, M.A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988) 85, 8998-9002; Belyavsky, A. et al., Nucleic Acids Res. (1989) 17, 2919-2932)にしたがい、cDNAの合成及び増幅を行うことができる。得られたPCR産物から目的とするDNA断片を調製し、ベクターDNAと連結する。目的とするDNAの塩基配列は、公知の方法、例えば、ジデオキシヌクレオチドチェーンターミネーション法により確認することができる。

【 0 0 5 3 】

単離された遺伝子は、適宜ベクターに挿入する。ベクターとしては、例えば、大腸菌を宿主とする場合には、ベクターを大腸菌(例えば、JM109、DH5 α 、HB101、XL1-Blue)などで増幅させ大量調製するために、大腸菌で増幅されるための「ori」をもち、さらに形質転換された大腸菌の選抜遺伝子(例えば、なんらかの薬剤(アンピシリンやテトラサイクリン、カナマイシン、クロラムフェニコール)により判別できるような薬剤耐性遺伝子)を有すれば特に制限はない。ベクターの例としては、M13系ベクター、pUC系ベクター、pBR322、pBluescript、pCR - Scriptなどが挙げられる。

【 0 0 5 4 】

また、cDNAのサブクローニング、切り出しを目的とした場合、上記ベクターの他に、例えば、pGEM-T、pDIRECT、pT7などが挙げられる。遺伝子がコードする蛋白質を生産する目的においてベクターを使用する場合には、特に、発現ベクターが有用である。発現ベクターとしては、例えば、大腸菌での発現を目的とした場合は、ベクターが大腸菌で増幅されるような上記特徴を持つほかに、宿主をJM109、DH5 α 、HB101、XL1-Blueなどの大腸菌とした場合においては、大腸菌で効率よく発現できるようなプロモーター、例えば、lacZプロモーター(Ward, E.S. et al. (1989) Nature 341, 544-546; Ward, E.S. (1992) FASEB J. 6, 2422-2427)、araBプロモーター(Better, M. et al. (1988) Science 240, 1041-1043)、又はT

7プロモーターなどを持っていることが不可欠である。このようなベクターとしては、上記ベクターの他にpGEX-5X-1(ファルマシア社製)、「QIAexpress system」(キアゲン社製)、pEGEP、又はpET(この場合、宿主はT7 RNAポリメラーゼを発現しているBL21が好ましい)などが挙げられる。

【0055】

また、ベクターには、ポリペプチド分泌のためのシグナル配列が含まれていてもよい。蛋白質分泌のためのシグナル配列としては、大腸菌のペリプラズムに産生させる場合、pelBシグナル配列(Lei, S. P. et al. J. Bacteriol. (1987) 169, 4379)を使用すればよい。宿主細胞へのベクターの導入は、例えば、塩化カルシウム法、エレクトロポレーション法を用いて行うことができる。大腸菌以外にも、例えば蛋白質を製造するためのベクターとしては、哺乳動物由来の発現ベクター(例えば、pcDNA3(インビトロゲン社製)や、pEF-BOS (Nucleic Acids. Res. 1990, 18(17), p5322)、pEF、pCDM8)、昆虫細胞由来の発現ベクター(例えば「BAC-T0-BAC Baculovirus Expression Systems」(ギブコBRL社製)、pBacPAK8)、植物由来の発現ベクター(例えば、pMH1、pMH2)、動物ウイルス由来の発現ベクター(例えば、pHSV、pMV、pAdexLcw)、レトロウイルス由来の発現ベクター(例えば、pZIPneo)、酵母由来の発現ベクター(例えば、「Pichia Expression Kit」(インビトロゲン社製)、pNV11、SP-Q01)、枯草菌由来の発現ベクター(例えば、pPL608、pKTH50)が挙げられる。

【0056】

また、CHO細胞、COS細胞、NIH3T3細胞等の動物細胞での発現を目的とした場合には、細胞内で発現させるために必要なプロモーター、例えば、SV40プロモーター(Mulligan, R. C. et al. (1979) Nature 277, 108-114)、HMLV-LTRプロモーター、EF1 α プロモーター(Mizushima, S. and Nagata, S. (1990) Nucleic Acids Res. 18, 5322)、CMVプロモーター等を持っていることが不可欠であり、細胞への形質転換を選抜するための遺伝子(例えば、薬剤(ネオマイシン、G418等)により判別できるような薬剤耐性遺伝子)を有すればさらに好ましい。このような特性を有するベクターとしては、例えば、pMAM、pDR2、pBK-RSV、pBK-CMV、pOPRSV、pOP13等が挙げられる。

【0057】

さらに、細胞内でのコピー数の増幅を目的とした宿主ベクター系においては、安定産生細胞株を得る場合は、核酸合成経路を欠損したCHO細胞にそれを相補するDHFR遺伝子を有するベクター(例えば、pCHOIなど)を導入し、メトトレキセート(MTX)により増幅させる方法が挙げられ、また、遺伝子の一過性の発現を目的とする場合には、SV40 T抗原を発現する遺伝子を染色体上に持つCOS細胞を用いてSV40の複製起点を持つベクター(pcDなど)で形質転換する方法が挙げられる。複製開始点としてはまた、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、ウシパピローマウイルス(BPV)等に由来するものを用いることもできる。さらに、宿主細胞系で遺伝子コピー数増幅のため、発現ベクターは選択マーカーとして、アミノグリコシドトランスフェラーゼ(APH)遺伝子、チミジンキナーゼ(TK)遺伝子、大腸菌キサンデンングアニンホスホリポシルトランスフェラーゼ(Ecogpt)遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素(dhfr)遺伝子等を含むことができる。

【0058】

一方、動物の生体内で遺伝子を発現させる方法としては、該遺伝子を適当なベクターに組み込み、例えば、レトロウイルス法、リポソーム法、カチオニックリポソーム法、アデノウイルス法などにより生体内に導入する方法などが挙げられる。これにより、該遺伝子の変異又は多型に起因する疾患等の表現型に対する遺伝子治療等を行うことが可能である。用いられるベクターとしては、例えば、アデノウイルスベクター(例えばpAdexlcw)やレトロウイルスベクター(例えば、pZIPneo)などが挙げられるが、これらに制限されない。ベクターへのDNA断片の挿入などの一般的な遺伝子操作は、常法に従って行うことが可能である(Sambrook, J. et al. (1989)Molecular Cloning 2nd ed., 5.61-5.63, Cold Spring Harbor Lab. press)。生体内への投与は、ex vivo法であっても、in vivo法であってもよい。

【0059】

ベクターが導入される宿主細胞としては特に制限はなく、例えば、大腸菌や種々の動物細胞などを用いることが可能である。宿主細胞は、例えば、蛋白質の製造や発現のための産生系として使用することができる。蛋白質製造のための産生

系は、in vitro及びin vivoの産生系がある。In vitroの産生系としては、真核細胞を使用する産生系や原核細胞を使用する産生系が挙げられる。

真核細胞を使用する場合、例えば、動物細胞、植物細胞、真菌細胞を宿主に用いることができる。動物細胞としては、哺乳類細胞、例えば、CHO、COS、3T3、ミエローマ、BHK((baby hamster kidney)、HeLa、Vero、両生類細胞、例えば、アフリカツメガエル卵母細胞(Valle, et al., Nature (1981) 291, 358-340)、あるいは昆虫細胞、例えば、Sf9、Sf21、Tn5が知られている。CHO細胞としては、特に、DHFR遺伝子を欠損したCHO細胞であるdhfr-CHO (Urlaub, G. and Chasin, L. A. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4216-4220)やCHO K-1(Ka0, F. T. And Puck, T. T. (1968) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 60, 1275-1281)を使用することができる。動物細胞において、大量発現を目的とする場合には特にCHO細胞が好ましい。

【0060】

宿主細胞へのベクターの導入は、例えば、リン酸カルシウム法、DEAEデキストラン法、カチオニックリボソームDOTAP(ベーリンガーマンハイム社製)を用いた方法、エレクトロポレーション法、リポフェクションなどの方法で行うことが可能である。

植物細胞としては、例えば、ニコチアナ・タバカム(Nicotiana tabacum)由来の細胞が蛋白質生産系として知られており、これをカルス培養すればよい。真菌細胞としては、酵母、例えば、サッカロミセス(Saccharomyces)属、例えば、サッカロミセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae)、糸状菌、例えば、アスペルギルス(Aspergillus)属、例えば、アスペルギルス・ニガー(Aspergillus niger)が知られている。

【0061】

原核細胞を使用する場合、細菌細胞を用いる産生系がある。細菌細胞としては、大腸菌(E. coli)、例えば、JM109、DH5 α 、HB101等が挙げられ、その他、枯草菌が知られている。

これらの細胞を目的とするDNAにより形質転換し、形質転換された細胞をin vitroで培養することにより蛋白質が得られる。培養は、公知の方法に従い行うこ

とができる。例えば、動物細胞の培養液として、例えば、DMEM、MEM、RPMI1640、IMDMを使用することができる。その際、牛胎児血清(FCS)等の血清補液を併用することもできるし、無血清培養してもよい。培養時のpHは、約6～8であるのが好ましい。培養は、通常、約30～40℃で約15～200時間行い、必要に応じて培地の交換、通気、攪拌を加える。

【0 0 6 2】

一方、in vivoで蛋白質を産生させる系としては、例えば、動物を使用する産生系や植物を使用する産生系が挙げられる。これらの動物又は植物に目的とするDNAを導入し、動物又は植物の体内で蛋白質を産生させ、回収する。本発明における「宿主」とは、これらの動物、植物を包含する。

動物を使用する場合、哺乳類動物、又は昆虫を用いる産生系がある。哺乳類動物としては、ヤギ、ブタ、ヒツジ、マウス、ウシを用いることができる(Vicki Glaser, SPECTRUM Biotechnology Applications, 1993)。また、哺乳類動物を用いる場合、トランスジェニック動物を用いることができる。例えば、目的とするDNAを、ヤギ β カゼインのような乳汁中に固有に産生される蛋白質をコードする遺伝子との融合遺伝子として調製する。次いで、この融合遺伝子を含むDNA断片をヤギの胚へ注入し、この胚を雌のヤギへ移植する。胚を受容したヤギから生まれるトランスジェニックヤギ又はその子孫が産生する乳汁から、目的の蛋白質を得ることができる。トランスジェニックヤギから産生される蛋白質を含む乳汁量を増加させるために、適宜ホルモンをトランスジェニックヤギに使用してもよい(Ebert, K. M. et al., Bio/Technology (1994)12, 699-702)。

【0 0 6 3】

また、昆虫としては、例えば、カイコを用いることができる。カイコを用いる場合、目的の蛋白質をコードするDNAを挿入したバキュロウイルスをカイコに感染させることにより、このカイコの体液から目的の蛋白質を得ることができる(Susumu, M. et al., Nature(1985)315, 592-594)。

さらに、植物を使用する場合、例えば、タバコを用いることができる。タバコを用いる場合、目的とする蛋白質をコードするDNAを植物発現用ベクター、例えば、pMON 530に挿入し、このベクターをアグロバクテリウム・ツメファシェンス

(*Agrobacterium tumefaciens*)のようなバクテリアに導入する。このバクテリアをタバコ、例えば、ニコチアナ・タバカム(*Nicotiana tabacum*)に感染させ、本タバコの葉より所望のポリペプチドを得ることができる(Ma, J. K. et al. (1994) *Eur. J. Immunol.* 24, 131-138)。

【0064】

これらの方法により得られたタンパク質は、宿主細胞内又は細胞外(培地など)から単離し、実質的に純粋で均一な蛋白質として精製することができる。蛋白質の分離、精製は、通常の蛋白質の精製で使用されている分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。例えば、クロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、溶媒沈殿、溶媒抽出、蒸留、免疫沈降、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動法、透析、再結晶等を適宜選択、組み合わせれば蛋白質を分離、精製することができる。

【0065】

クロマトグラフィーとしては、例えば、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー等が挙げられる(*Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual*. Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996)。

これらのクロマトグラフィーは、液相クロマトグラフィー、例えば、HPLC、FPLC等の液相クロマトグラフィーを用いて行うことができる。これらの精製方法を用い、高度に精製された蛋白質を得ることができる。

【0066】

なお、蛋白質を精製前又は精製後に適当な蛋白質修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加たり部分的にペプチドを除去することもできる。蛋白質修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、リシルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グルコシダーゼなどが用いられる。

このようにして得た蛋白質を用いれば、標的遺伝子がコードする蛋白質に対する抗体を調整することができる。抗体の形態には、特に制限はなく、ポリクローナル抗体の他、モノクローナル抗体も含まれる。また、ウサギなどの免疫動物に

該蛋白質を免疫して得た抗血清、すべてのクラスのポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体、さらにヒト抗体や遺伝子組み換えによるヒト型化抗体も含まれる。

【0067】

抗体取得の感作抗原として使用される蛋白質は、その由来となる動物種に制限されないが哺乳動物、例えば、ヒト、マウス又は、ラット由来の蛋白質が好ましく、特にヒト由来の蛋白質が好ましい。

本発明において、感作抗原として使用される蛋白質は、完全な蛋白質であってもよいし、また、蛋白質の部分ペプチドであってもよい。蛋白質の部分ペプチドとしては、例えば、蛋白質のアミノ基(N)末端断片やカルボキシ(C)末端断片が挙げられる。本明細書で述べる「抗体」とは蛋白質の全長又は断片に反応する抗体を意味する。

抗体を調製するには、標的遺伝子又はその断片を公知の発現ベクター系に挿入し、該ベクターで本明細書で述べた宿主細胞を形質転換させ、該宿主細胞内外から目的の蛋白質又はその断片を公知の方法で得て、これら有感作抗原として用いればよい。また、蛋白質を発現する細胞、又はその溶解物あるいは化学的に合成した蛋白質有感作抗原として使用してもよい。短いペプチドは、キーホールリンペットヘモシアニン、ウシ血清アルブミン、卵白アルブミンなどのキャリア蛋白質と適宜結合させて抗原とすることが好ましい。

【0068】

感作抗原で免疫される哺乳動物としては、特に限定されるものではないが、細胞融合に使用する親細胞との適合性を考慮して選択するのが好ましく、一般的には、げっ歯目、ウサギ目、霊長目の動物が使用される。

げっ歯目の動物としては、例えば、マウス、ラット、ハムスター等が使用される。ウサギ目の動物としては、例えば、ウサギが使用される。霊長目の動物としては、例えば、サルが使用される。サルとしては、狭鼻下目のサル（旧世界ザル）例えば、カニクイザル、アカゲザル、マントヒヒ、チンパンジー等が使用される。

【0069】

感作抗原を動物に免疫するには、公知の方法にしたがって行われる。一般的方法としては、感作抗原を哺乳動物の腹腔内又は、皮下に注射する。具体的には、感作抗原をPBS(Phosphate-Buffered Saline)や生理食塩水等で適当量に希釈、懸濁したものに対し、所望により通常のアジュバント、例えば、フロイント完全アジュバントを適量混合し、乳化後、哺乳動物に投与する。さらに、その後、フロイント不完全アジュバントに適量混合した感作抗原を、4～21日毎に数回投与することが好ましい。また、感作抗原免疫時に適当な担体を使用することができる。このように免疫し、血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを常法により確認する。

【0070】

ポリクローナル抗体を得るには、血清中の所望の抗体レベルが上昇したことを確認した後、抗原を感作した哺乳動物の血液を取り出す。この血液から公知の方法により血清を分離する。ポリクローナル抗体としては、ポリクローナル抗体を含む血清を使用してもよいし、必要に応じこの血清からポリクローナル抗体を含む画分をさらに単離して、さらにこの画分をプロテインAあるいはプロテインGカラムを利用して精製することにより、免疫グロブリンGあるいはMを調整することができる。

【0071】

モノクローナル抗体を得るには、上記抗原を感作した哺乳動物の血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを確認した後に、哺乳動物から免疫細胞を取り出し、細胞融合に付せばよい。この際、細胞融合に使用される好ましい免疫細胞として、特に脾細胞が挙げられる。前記免疫細胞と融合される他方の親細胞としては、好ましくは哺乳動物のミエローマ細胞、より好ましくは、薬剤による融合細胞選別のための特性を獲得したミエローマ細胞が挙げられる。

【0072】

前記免疫細胞と、ミエローマ細胞の細胞融合は基本的には公知の方法、例えば、ミルステインらの方法(Galfre, G. and Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73, 3-46) 等に準じて行うことができる。

細胞融合により得られたハイブリドーマは、通常を選択培養液、例えば、HAT

培養液（ヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジンを含む培養液）で培養することにより選択される。当該HAT培養液での培養は、目的とするハイブリドーマ以外の細胞（非融合細胞）が死滅するのに十分な時間、通常、数日～数週間継続して行う。次いで、通常の限界希釈法を実施し、目的とする抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニング及びクローニングを行う。

【0073】

また、ヒト以外の動物に抗原を免疫して上記ハイブリドーマを得る他に、ヒトリンパ球、例えば、EBウイルスに感染したヒトリンパ球をin vitroで蛋白質、蛋白質発現細胞、又はその溶解物で感作し、感作リンパ球をヒト由来の永久分裂能を有するミエローマ細胞、例えばU266と融合させ、蛋白質への結合活性を有する所望のヒト抗体を産生するハイブリドーマを得ることもできる（特開昭63-17688号公報）。

【0074】

次いで、得られたハイブリドーマをマウス腹腔内に移植し、同マウスより腹水を回収し、得られたモノクローナル抗体を、例えば、硫酸沈殿、プロテインA、プロテインGカラム、DEAEイオン交換クロマトグラフィー、標的遺伝子がコードする蛋白質をカップリングしたアフィニティーカラムなどにより精製することで調製することが可能である。調製された抗体は、標的遺伝子がコードする蛋白質の精製、検出に用いられる他、該蛋白質のアゴニストやアンタゴニストの候補になる。また、この抗体を疾患に対する抗体治療へ応用することも考えられる。得られた抗体を人体に投与する目的（抗体治療）で使用する場合には、免疫原性を低下させるため、ヒト抗体やヒト型抗体が好ましい。

【0075】

例えば、ヒト抗体遺伝子のレパートリーを有するトランスジェニック動物に抗原となる蛋白質、蛋白質発現細胞又はその溶解物を免疫して抗体産生細胞を取得し、これをミエローマ細胞と融合させたハイブリドーマを用いて蛋白質に対するヒト抗体を取得することができる（国際公開番号W092-03918、W093-2227、W094-02602、W094-25585、W096-33735及びW096-34096参照）。ハイブリドーマを用いて抗体を産生する以外に、抗体を産生する感作リンパ球等の免疫細胞を癌遺伝子(o

ncogene)により不死化させた細胞を用いてもよい。

【0076】

このように得られたモノクローナル抗体はまた、遺伝子組み換え技術を用いて産生させた組換え型抗体として得ることができる（例えば、Borrebaeck, C. A. K. and Larrick, J. W., THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, Published in the United Kingdom by MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990参照）。

組換え型抗体は、それをコードするDNAをハイブリドーマ又は抗体を産生する感作リンパ球等の免疫細胞からクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させる。本発明は、この組換え型抗体を包含する。

さらに、本発明において抗体は、標的遺伝子がコードする蛋白質に結合する限り、その抗体断片や抗体修飾物であってよい。例えば、抗体断片としては、Fab、F(ab)2、Fv又はH鎖とL鎖のFvを適当なリンカーで連結させたシングルチェーン Fv(scFv) (Huston, J. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA (1988)85, 5879-5883)が挙げられる。具体的には、抗体を酵素、例えば、パパイン、ペプシンで処理し抗体断片を生成させるか、又は、これら抗体断片をコードする遺伝子を構築し、これらを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させる（例えば、Co, M. S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976; Better, M. and Horwitz, A. H., Methods Enzymol. (1989) 178, 476-496; Pluckthum, A. and Skerra, A., Methods Enzymol. (1989) 178, 497-515; Lamoyi, E., Methods Enzymol. (1986) 121, 652-663; Roussequx, J. et al., Methods Enzymol. (1986) 121, 663-669; Bird, R. E. and Walker, B. W., Trends Biotechnol. (1991) 9, 132-137参照）。

【0077】

抗体修飾物として、ポリエチレングリコール(PEG)等の各種分子と結合した抗体を使用することもできる。本発明において「抗体」にはこれらの抗体修飾物も包含される。このような抗体修飾物は、得られた抗体に化学的な修飾を施すことによって得ることができる。これらの方法はこの分野において既に確立されている。

また、本発明において抗体は、公知の技術を使用して非ヒト抗体由来の可変領

域とヒト抗体由来の定常領域からなるキメラ抗体又は非ヒト抗体由来のCDR(相補性決定領域)とヒト抗体由来のFR(フレームワーク領域)及び定常領域からなるヒト型化抗体として得ることができる。

【0078】

前記のように得られた抗体は、均一になるまで精製することができる。本発明で使用される抗体の分離、精製は通常の蛋白質で使用されている分離、精製方法を使用すればよい。例えば、アフィニティークロマトグラフィー等のクロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、透析、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動等を適宜選択、組み合わせれば、抗体を分離、精製することができる(Antibodies: A Laboratory Manual. Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)が、これらに限定されるものではない。上記で得られた抗体の濃度測定は吸光度の測定又は酵素結合免疫吸着検定法(Enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA)等により行うことができる。

【0079】

アフィニティークロマトグラフィーに用いるカラムとしては、プロテインAカラム、プロテインGカラムが挙げられる。例えば、プロテインAカラムを用いたカラムとしてHyper D, POROS, Sepharose F. F. (Pharmacia)等が挙げられる。

アフィニティークロマトグラフィー以外のクロマトグラフィーとしては、例えば、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー等が挙げられる(Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996)。これらのクロマトグラフィーはHPLC、FPLC等の液相クロマトグラフィーを用いて行うことができる。

【0080】

また、抗体の抗原結合活性を測定する方法として、例えば、吸光度の測定、酵素結合免疫吸着検定法(Enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA)、EIA(酵素免疫測定法)、RIA(放射免疫測定法)あるいは蛍光抗体法を用いることができる。ELISAを用いる場合、抗体を固相化したプレートに標的蛋白質を添加し、次いで

目的の抗体を含む試料、例えば、抗体産生細胞の培養上清や精製抗体を加える。酵素、例えば、アルカリフォスファターゼ等で標識した抗体を認識する二次抗体を添加し、プレートをインキュベーションし、次いで洗浄した後、p-ニトロフェニル燐酸などの酵素基質を加えて吸光度を測定することで抗原結合活性を評価することができる。蛋白質として蛋白質の断片、例えばそのC末端からなる断片あるいはN末端からなる断片を使用してもよい。抗体の活性評価には、BIAcore(Pharmacia製)を使用することができる。

【0081】

これらの手法を用いることにより、抗体と試料中に含まれる標的遺伝子がコードする蛋白質が含まれると予想される試料とを接触せしめ、該抗体と該蛋白質との免疫複合体を検出又は測定することからなる、該遺伝子がコードする蛋白質の検出又は測定方法を実施することができる。この測定方法は、該遺伝子がコードする蛋白質を特異的に検出又は測定することができるため、該蛋白質を用いた種々の実験、検査、診断等に有用である。

【0082】

また、本発明は、標的遺伝子の一方の鎖又はその相補鎖に相補的な少なくとも15ヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを提供する。

ここで「相補鎖」とは、A:T(ただしRNAの場合はU)、G:Cの塩基対からなる2本鎖核酸の一方の鎖に対する他方の鎖を指す。また、「相補的」とは、少なくとも15個の連続したヌクレオチド領域で完全に相補配列である場合に限られず、少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは90%、さらに好ましくは95%以上の塩基配列上の相同性を有すればよい。蛋白質の相同性を決定するには、文献(Wilbur, W.J. and Lipman, D.J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1983) 80, 726-730)に記載のアルゴリズムにしたがえばよい。

【0083】

このような核酸には、標的遺伝子の検出や増幅に用いるプローブやプライマー、該遺伝子の発現を検出するためのプローブやプライマー、該遺伝子の発現を制御するためのヌクレオチド又はヌクレオチド誘導体(例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドやリボザイム、又はこれらをコードするDNA等)が含まれる。ここ

で、遺伝子の検出には、遺伝子の変異の検出も含まれる。また、このような核酸は、DNAチップの作製に利用することもできる。

【0084】

上記ポリヌクレオチドをプライマーとして用いる場合、3側の領域は相補的とし、5側には制限酵素認識配列やタグなどを付加することができる。アンチセンスオリゴヌクレオチドとしては、例えば、蛋白質のコード領域中のいずれかの箇所にハイブリダイズするアンチセンスオリゴヌクレオチドが含まれる。このアンチセンスオリゴヌクレオチドは、好ましくは蛋白質のコード領域中の連続する少なくとも15個以上のヌクレオチドに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドである。さらに好ましくは、連続する少なくとも15個以上のヌクレオチドが翻訳開始コドンを含むアンチセンスオリゴヌクレオチドである。

【0085】

アンチセンスオリゴヌクレオチドとしては、それらの誘導体や修飾体を使用することができる。修飾体として、例えばメチルホスホネート型又はエチルホスホネート型のような低級アルキルホスホネート修飾体、ホスホロチオエート修飾体又はホスホアミデート修飾体等が挙げられる。

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、DNA又はmRNAの所定の領域を構成するヌクレオチドに対応するヌクレオチドが全て相補配列であるもののみならず、オリゴヌクレオチドが標的遺伝子をコードするDNA又はmRNAに特異的にハイブリダイズできる限り、1又は複数個のヌクレオチドのミスマッチが存在しているものも含まれる。

【0086】

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体は、標的遺伝子がコードする蛋白質の産生細胞に作用して、該蛋白質をコードするDNA又はmRNAに結合することにより、その転写又は翻訳を阻害したり、mRNAの分解を促進したりして、該蛋白質の発現を抑制することにより、結果的に該蛋白質の作用を抑制する効果を有する。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体は、それらに対して不活性な適当な基剤と混和して塗布剤、パップ剤等の外用剤とすることができる。また、

必要に応じて、賦形剤、等張化剤、溶解補助剤、安定化剤、防腐剤、無痛化剤等を加えて錠剤、散剤、顆粒剤、カプセル剤、リポソームカプセル剤、注射剤、液剤、点鼻剤など、さらに凍結乾燥剤とすることができる。これらは常法にしたがって調製することができる。

【0087】

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体は、患者の患部に直接適用するか、又は血管内に投与するなどして結果的に患部に到達し得るように患者に適用する。さらには、持続性、膜透過性を高めるアンチセンス封入素材を用いることもできる。例えば、リポソーム、ポリ-L-リジン、リピット、コレステロール、リボフェクチン又はこれらの誘導体が挙げられる。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体の投与量は、患者の状態に応じて適宜調整し、好ましい量を用いることができる。例えば、0.1~100mg/kg、好ましくは0.1~50mg/kgの範囲で投与することができる。

【0088】

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、標的遺伝子がコードする蛋白質の発現を阻害し、従って該蛋白質の生物学的活性を抑制することにおいて有用である。また、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドを含有する発現阻害剤は、該蛋白質の生物学的活性を抑制することが可能である点で有用であり、医薬への応用だけでなく、該遺伝子の機能解析のツールとしても有用である。

【0089】

標的遺伝子がコードする蛋白質に対する抗体、又は該遺伝子の方の鎖又はその相補鎖に相補的な少なくとも15ヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを利用して、遺伝子又は蛋白質の変異又は発現の検査を行うことができる。標的遺伝子が疾患に関与する場合は、該抗体又は該ポリヌクレオチドを利用して疾患の検査を行うことができる。なお、本発明において疾患の検査には、疾患原因遺伝子の変異に起因して疾患の症状を発現している患者の検査のみならず、被験者が疾患原因遺伝子の発現量の異常又は遺伝子の変異に起因して該疾患にかかりやすいか否かを判断するために行う、疾患原因遺伝子の発現量の検査、及び遺伝子の変異の検査も含まれる。すなわち、疾患原因遺伝子の発現の異常や、疾患原因遺伝子

の片方の対立遺伝子に変異が生じることなどにより、表面上は未だ症状を発現していない場合においても、該疾患にかかる危険性が非常に増大しているものと考えられる。また、疾患に限らず、その他の遺伝要因を持つ表現型に対しても、例えばその原因遺伝子を有するか否かを検査したり、その遺伝子の変異や発現の検査を行うことができる。

【0090】

抗体を利用して疾患等の検査を行うには、例えば、被検試料中における原因遺伝子がコードする蛋白質を検出する工程を含む方法が含まれる。原因遺伝子がコードする蛋白質に対する抗体を用いた検査は、具体的には、(a)被検試料に上記の抗体を接触させる工程、(b)該被検試料への該抗体の結合を検出する工程を含む。蛋白質の検出は、抗体を用いた免疫沈降、ウエスタンブロット、免疫組織化学、ELISAなどにより行うことができる。

【0091】

また、本発明の検査には、遺伝子の転写産物又はそのcDNAの塩基配列、及びゲノムDNA配列(内因性転写制御配列も含む)の塩基配列、又はその相補鎖と相補的なポリヌクレオチド(プローブ及びプライマー)が利用されうる。なお、変異の検査には、対立遺伝子の片方のアレルに変異を持つ「キャリアー」を特定するための検査も含まれる。

プライマーとして用いられる場合、ポリヌクレオチドは、通常、15bp~100bpであり、好ましくは17bp~30bpである。プライマーは、標的遺伝子又はその発現を調節する領域の少なくとも一部を増幅しうるものであればいかなるものでもよい。このような領域としては、例えば、遺伝子のエキソン領域、イントロン領域、プロモーター領域、エンハンサー領域が含まれる。

【0092】

一方、プローブとしてのポリヌクレオチドは、合成ポリヌクレオチドであれば通常、少なくとも15bp以上の鎖長を有する。プラスミドDNAなどのベクターに組み込んだクローンから得た二本鎖DNAをプローブとして用いることも可能である。プローブとしては、遺伝子又はその発現を調節する領域の少なくとも一部の塩基配列又はそれらの相補鎖に相補的であればいかなるものでもよい。

【0093】

プローブがハイブリダイズする領域としては、例えば、遺伝子のエクソン領域、イントロン領域、プロモーター領域、エンハンサー領域が含まれる。プローブとして用いる場合、ポリヌクレオチドあるいは二本鎖DNAは適宜標識して用いられる。標識する方法としては、例えば、T4ポリヌクレオチドキナーゼを用いてポリヌクレオチドの5末端を $3'2'$ Pでリン酸化することにより標識する方法や、クレノウ酵素などのDNAポリメラーゼを用い、ランダムヘキサマーオリゴヌクレオチドなどをプライマーとして $3'2'$ Pなどのアイソトープや、蛍光色素あるいはピオチンなどによって標識された基質塩基を取り込ませる方法(ランダムプライム法など)が挙げられる。

【0094】

標的遺伝子がコードする蛋白質に対する抗体、又は該遺伝子の一方の鎖又はその相補鎖に、相補的な少なくとも15ヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを利用した検査方法の一つは、被検試料中における標的遺伝子の転写産物を検出する工程を含む方法である。このような検査方法は、(a)被検試料に上記のポリヌクレオチドを接触させる工程、(b)該被検試料中のmRNAへの該ポリヌクレオチドの結合を検出する工程を含む方法が含まれる。このような検査は、例えばノーザンハイブリダイゼーションやRT-PCRなどにより行うことができる。

【0095】

RT-PCRを利用した検査は、具体的には(a)被検試料中のmRNAからcDNAを合成する工程、(b)合成したcDNAを鋳型に、本発明のポリヌクレオチドをプライマーとして用いて、ポリメラーゼ連鎖反応を行なう工程、(c)ポリメラーゼ連鎖反応により増幅されたDNAを検出する工程、を含む。ノーザンハイブリダイゼーションやRT-PCRは、公知の遺伝子工学技術により行うことができる。また、DNAチップ又はDNAマイクロアレイによる検出も可能である。

【0096】

また、疾患等の検査は、標的遺伝子における変異又は多型を検出することによって行うことも考えられる。すなわち、標的遺伝子のコード領域又は転写制御領域における変異又は多型を検出することにより検査を行うことができる。

このような検査法の一つの態様は、被験者の標的遺伝子の塩基配列を直接決定する方法である。例えば、上記ヌクレオチドをプライマーとして、被験者から単離したDNAを鋳型として、PCR (Polymerase Chain Reaction) 法などにより被験者の標的遺伝子の一部、若しくは全部（例えば、エキソン、イントロン、プロモーター、エンハンサーを含む領域）を増幅し、その塩基配列の決定を行う。これを対照者（例えば健常者等）の該遺伝子の配列と比較することにより検査を行うことができる。

【0097】

検査方法としては、このように直接被験者由来のDNAの塩基配列を決定する方法以外に種々の方法が用いられる。その一つの態様は、(a) 被験者からDNA試料を調製する工程、(b) 本発明のポリヌクレオチドをプライマーとして被験者由来のDNAを増幅する工程、(c) 増幅したDNAを一本鎖DNAに解離させる工程、(d) 解離させた一本鎖DNAを非変性ゲル上で分離する工程、及び(e) 分離した一本鎖DNAのゲル上での移動度を対照者の場合と比較する工程、を含む。

【0098】

このような方法として、PCR-SSCP(single-strand conformation polymorphism, 一本鎖高次構造多型法(Cloning and polymerase chain reaction-single-strand conformation polymorphism analysis of anonymous Alu repeats on chromosome 11. Genomics. 1992 Jan 1; 12(1): 139-146., Detection of p53 gene mutations in human brain tumors by single-strand conformation polymorphism analysis of polymerase chain reaction products. Oncogene. 1991 Aug 1; 6(8): 1313-1318., Multiple fluorescence-based PCR-SSCP analysis with postlabeling., PCR Methods Appl. 1995 Apr 1; 4(5):275-282.)が挙げられる。

【0099】

この方法は操作が比較的簡単であり、また試料の量も少なくてすむなどの利点を有するため、特に多数のDNAサンプルをスクリーニングするのに好適である。その原理は以下のとおりである。二本鎖DNA断片を一本鎖に解離すると、各鎖はその塩基配列に依存した独自の高次構造を形成する。この解離したDNA鎖を変性剤を含まないポリアクリルアミドゲル中で電気泳動すると、それぞれの高次構造

の差に応じて、相補的な同じ鎖長の一本鎖DNAが異なる位置に移動する。一塩基の置換によってもこの一本鎖DNAの高次構造は変化し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動において異なる移動度を示す。従って、この移動度の変化を検出することによりDNA断片に点突然変異や欠失、あるいは挿入などによる変異が存在することを検出することができる。

【0 1 0 0】

具体的には、まず、標的遺伝子の一部、あるいは全部をPCR法などによって増幅する。増幅される範囲としては、通常200～400bp程度の長さが好ましい。また、増幅される領域としては一遺伝子の全てのエキソン、全てのイントロンの他、遺伝子のプロモーター、エンハンサーも含まれる。PCRによる遺伝子断片増幅の際、 ^32P などのアイソトープ、あるいは蛍光色素やピオチンなどによって標識したプライマーを用いるか、あるいはPCR反応液に ^32P などのアイソトープ、あるいは蛍光色素やピオチンなどによって標識した基質塩基を加えてPCRを行うことによって合成されるDNA断片を標識する。あるいはPCR反応後にクレノウ酵素などを用いて ^32P などのアイソトープ、あるいは蛍光色素やピオチンなどによって標識した基質塩基を合成されたDNA断片に付加することによっても標識を行うことができる。

【0 1 0 1】

こうして得られた標識DNA断片を熱を加えることなどにより変性し、尿素などの変性剤を含まないポリアクリルアミドゲルによって電気泳動を行う。この際、ポリアクリルアミドゲルに適量(5から10%程度)のグリセロールを添加することにより、DNA断片の分離の条件を改善することができる。また、泳動条件は各DNA断片の性質により変動するが、通常、室温(20から25℃)で行い、好ましい分離が得られないときには4から30℃までの最適な移動度を与える温度を検討する。

【0 1 0 2】

電気泳動後、DNA断片の移動度を、X線フィルムを用いたオートラジオグラフィや、蛍光を検出するスキャナー等で検出し、解析する。移動度に差があるバンドが検出された場合、このバンドを直接ゲルから切り出し、PCRによって再度増幅し、それを直接シーケンシングすることにより、変異の存在を確認するこ

とができる。また、標識したDNAを使わない場合においても、電気泳動後のゲルをエチジウムブロマイドや銀染色法などによって染色することによって、バンドを検出することができる。

【0103】

本発明の検査方法の他の態様は、(a)被検者からDNA試料を調製する工程、(b)本発明のポリヌクレオチドをプライマーとして用いて被検者由来のDNAを増幅する工程、(c)増幅したDNAを切断する工程、(d)DNA断片をその大きさに応じて分離する工程、(e)分離したDNA断片に対し、検出可能な標識をした本発明のポリヌクレオチドをプローブとしてハイブリダイズさせる工程、及び(f)検出されたDNA断片の大きさを、対照者の場合と比較する工程、を含む。

【0104】

このような方法としては、制限酵素断片長多型(Restriction Fragment Length Polymorphism/RFLP)を利用した方法、PGR-RFLP法などが挙げられる。DNAを切断する酵素としては、通常、制限酵素を用いる。具体的には、制限酵素の認識部位に変異又は多型が存在する場合、あるいは制限酵素処理によって生じるDNA断片内に塩基挿入、又は欠失がある場合、制限酵素処理後に生じる断片の大きさが対照(例えば健常者の場合)と比較して変化する。この変異又は多型を含む部分をPCR法によって増幅し、それぞれの制限酵素で処理することによって、これらの変異又は多型を電気泳動後のバンドの移動度の差として検出することができる。あるいは、染色体DNAをこれらの制限酵素によって処理し、電気泳動した後、上記ポリヌクレオチドをプローブとして用いてサザンブロッティングを行うことにより、変異又は多型の有無を検出することができる。

【0105】

用いられる制限酵素は、それぞれの検査部位に応じて適宜選択することができる。この方法では、ゲノムDNA以外にも被検者から調製したRNAを逆転写酵素でcDNAにし、これをそのまま制限酵素で切断した後サザンブロッティングを行うこともできる。またこのcDNAを鋳型としてPCRで標的遺伝子の一部、あるいは全部を増幅し、それを制限酵素で切断した後、移動度の差を調べることもできる。

また、被検者から調製したDNAの代わりにRNAを用いても同様に検出することが

可能である。このような方法は、(a)被検者からRNA試料を調製する工程、(b)大きさに応じて調製したRNAを分離する工程、(c)分離したRNAに対し検出可能な標識をした本発明のポリヌクレオチドをプローブとしてハイブリダイズさせる工程、及び(d)検出されたRNAの大きさを、対照者の場合と比較する工程、を含む。具体的な方法の一例としては、被検者から調製したRNAを電気泳動し、上記ポリヌクレオチドをプローブとして用いてノーザンブロッティングを行い、移動度の差を検出する。

【0106】

検査方法の他の態様は、(a)被検者からDNA試料を調製する工程、(b)本発明のポリヌクレオチドをプライマーとして被検者由来のDNAを増幅する工程、(c)増幅したDNAを、DNA変性剤の濃度が次第に高まるゲル上で分離する工程、及び(d)分離したDNAのゲル上での移動度を対照者の場合と比較する工程、を含む方法である。

このような方法としては、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法(denaturant gradient gel-electrophoresis: DGGE)が挙げられる。標的遺伝子の一部、あるいは全部を上記プライマーなどを用いたPCR法などによって増幅し、これを尿素などの変性剤の濃度が移動するに従って徐々に高くなっているポリアクリルアミドゲル中で電気泳動し、対照者(例えば健常者等)と比較する。変異が存在するDNA断片の場合、より低い変性剤濃度位置でDNA断片が一本鎖になり、極端に移動速度が遅くなるため、この移動度の差を検出することにより変異又は多型の有無を検出することができる。

【0107】

これら方法以外にも、特定位置の変異のみを検出する目的にはアレル特異的オリゴヌクレオチド(Alele Specific Oligonucleotide/ASO)ハイブリダイゼーション法が利用できる。変異が存在すると考えられる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドを作製し、これと試料DNAでハイブリダイゼーションを行わせると、変異が存在する場合、ハイブリッド形成の効率が低下する。それをサザンブロット法や、特殊な蛍光試薬がハイブリッドのギャップにインターカレーションすることにより消光する性質を利用した方法などにより検出できる。

【0108】

また、リボヌクレアーゼAミスマッチ切断法による検出も可能である。具体的には、標的遺伝子の一部、あるいは全部をPCR法などによって増幅し、これをプラスミドベクター等に組み込んだ標的遺伝子断片等から調製した標識RNAとハイブリダイゼーションを行う。変異が存在する部分においてはハイブリッドが一本鎖構造となるので、この部分をリボヌクレアーゼAによって切断し、これをオートラジオグラフィーなどで検出することによって変異の存在を検出することができる。

【0109】

【実施例】

〔実施例1〕

(1)DNA試料のサンプリング

各疾患の患者及び対照群となる健常者の血液サンプルを用いて遺伝子解析を実施するため、研究への参加を同意した日本人健常者464人、慢性関節リウマチ患者306人、及び尋常性乾癬患者118人から10～20mlの採血を行い、DNA試料を収集した。

【0110】

なお、研究を行なうにあたり、社団法人バイオ産業情報化コンソーシアム倫理審査委員会、東海大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会、東京大学大学院医学系研究科・医学部研究倫理審査委員会、順天堂大学医学部研究等倫理委員会において審査を受け、研究実施の承認を受けた上で研究を行った。

(2)DNA試料の調製

DNA試料の調製を下記の手順で行なった。まず、採取した血液からのゲノムDNAの抽出、精製を、QIAamp DNA Blood Maxi Kit (QIAGEN社) を用いて行った。カラムからのゲノムDNAの溶出は、PCRの増幅効率への影響を考慮し、EDTA濃度が通常の10分の1量であるT.E. (10 mM Tris-HCl、0.1 mM EDTA) を用いた。抽出後、アガロースゲル電気泳動によってDNAの分解が無いこと、及び吸光度測定結果の260/280比により純度を確認した。

【0111】

DNAの定量及び混合DNA（プール化DNA）溶液の調製は、以下の手順で行った。DNA 定量を行なうため、2本鎖DNAを特異的に染色する蛍光色素PicoGreen試薬（Molecular Probes社）と蛍光プレートリーダーを用いた。濃度測定時の標準試料には、PicoGreen試薬に添付されているλファージDNAを用い、5点の希釈系列（10、30、100、300、1000 pg/mL）とした。各個人のゲノムDNAを400倍に希釈し、それぞれ3回ずつ定量を行った。3回の定量結果より、2回分ずつの組み合わせを計3通りつくり、それぞれについて平均値、S.D.、C.V.を求めた。C.V.が5%以下でかつ最も低い値となる組合せを選択し、その平均値を最終的なDNA濃度として採用した。3通りの組合せのいずれにおいてもC.V.が5%を超える場合には、5%以下となる組合せが得られるまでDNA定量を繰り返した。

【0 1 1 2】

このような定量操作により決定したDNA濃度をもとに、125個体のDNA試料を一定 DNA量ずつ混合し、T.E.（10 mM Tris-HCl、0.1 mM EDTA）を加え、最終的に8 ng/μLのプール化試料とした。1次スクリーニング及び2次スクリーニングを行なうため、このような125個体からなるプール化DNA試料を各患者群、及び健常者群それぞれについて2セットずつ調製した。なお、各セットにおける125個体の性比は各患者群のプール化DNA試料と健常者群のプール化DNA試料の間で同一となるようにし、かつ年齢度数分布についても10歳階級にて両者の間で極力一致するよう選んだ。

【0 1 1 3】

(3) マイクロサテライト遺伝多型マーカー含有DNA配列断片群の調製(Pooled DNA genotyping)

各マイクロサテライト遺伝多型マーカー含有DNA配列群の増幅に使用したのは、配列番号1～配列番号2 7 0 8 8の塩基配列からなるDNA配列から得た、長さ15～100塩基、好ましくは15～25塩基、さらに好ましくは18～22塩基のフォワードプライマー及びリバースプライマーのセットである。該フォワードプライマーは、その5'末端部分を6-FAM又はHEX(PE Biosystems社, Foster City, CA)で蛍光標識したものをを用い、リバースプライマーには標識しなかった。

【0 1 1 4】

P C Rを行なうための反応液の調製は、次のように行った。反応液の総量20 μ L中に、24 ngのプール化 DNA試料 (8 ng/ μ Lのものを3 μ L)、2 μ Lの10×バッファー (100 mM Tris-HCl、pH 8.3、500 mM KCl、15 mM MgCl₂)、2 pmolのフォワードプライマーとリバースプライマー、0.5 UのAmpliTa_q DNA polymerase (アプライドバイオシステムズ社製) が含まれるよう調製した。P C Rのサイクルは96℃ 5分、56℃ 1分、72℃ 1分の処理を1サイクル、96℃ 45秒、57℃ 45秒、72℃ 45秒の処理を40サイクル行った。

【0 1 1 5】

得られたP C R産物は、それぞれの増幅効率に応じて、超純水により20倍、又は40倍に希釈し、真空ポンプもしくはエバポレータを用いて乾燥させた後に、ホルムアミド (アプライドバイオシステムズ社) とDNAサイズマーカーGS500 R0X (アプライドバイオシステムズ社) を含むバッファーに溶解した。96℃で、5分間熱処理した後、DNAアナライザABI 3700にて泳動し、GeneScan analysisソフトウェア (アプライドバイオシステムズ社) により、P C R産物に由来する各蛍光シグナルピークのサイズ決定作業を行った。作業後、PickPeakソフトウェアを用いて各ピークのサイズと高さを測定し、解析用データを作成した。

【0 1 1 6】

(4)統計計算

各MS遺伝多型マーカーDNA含有配列において、患者群のプール化DNA試料と健常者サンプル群のプール化DNA試料から得られる推定アリル頻度を比較し遺伝的相関解析を行うために、 χ^2 検定及びFisherの直接確率検定による統計処理を以下の手順にて行った。

ある一つの遺伝子座 (MS遺伝多型マーカー) ごとに、検出されたP C R産物由来の蛍光シグナルピークの高さの総和を求めた。これを分母として各アリルピークの高さの割合を算出し、各アリルにおける集団内での遺伝子頻度とした。統計処理を行う際には、プール化DNA試料に含まれるサンプルの合計アリル数を乗算することによって、各アリルの集団内での数を算出し、このアリル数を用いることによって、健常者群と患者群間におけるアリル頻度の差に関して検定を行った。

【0 1 1 7】

また、上記の方法によってプール化DNA試料を用いた遺伝的相関解析を行うにあたり、 2×2 及び $2 \times m$ 分割表を作成して χ^2 検定及びFisherの直接確率検定による統計量をそれぞれ求めた。これらの結果から、プール化DNA試料を用いた遺伝的相関解析が最適化される。これにより、今後、迅速な解析を実現する方法の検討、及びソフトウェアの開発を行った。

【0 1 1 8】

〔実施例 2〕 尋常性乾癬に関連する感受性遺伝子座の特定 (1)

実施例 1 に記載した方法により、尋常性乾癬に関連する感受性遺伝子座のゲノムワイド相関解析を行なうことができる。このスクリーニングにより、該遺伝子座が、第 6 染色体の動原体側の MICB 遺伝子からテロメア側の HLA-F 遺伝子に及び、HLA-B 及び HLA-C 遺伝子を含む 1.8Mb の HLA クラス I 領域内に、2- から 5-ヌクレオチド反復の範囲にあるマイクロサテライト座が 758 個あることが同定された。これは従来からの報告と一致する (Mizuki, N. et al. (1997) Genomics, 42, 55-66; Shiina, T. et al. (1998) Genomics, 47, 372-382; Shiina, T. et al. (1999) Immunol Rev., 167, 193-199; Tamiya, G. et al. (1998) Tissue Antigens, 51, 337-346)。

【0 1 1 9】

これらのマイクロサテライトのうち 70 個に関して、日本人集団における多型情報量を分析した。このうち 38 個は情報的価値が高くヘテロ接合度は平均で 66% であり、平均 8.9 種のアレルがあることが明らかになった (Tamiya, G. et al. (1998) Tissue Antigens, 51, 337-346; Tamiya, G. et al. (1999) Tissue Antigens 54: 221-228)。これら 38 個のマイクロサテライト反復部位を高分解能マッピングのために選択した。

【0 1 2 0】

既知の 7 つの多型遺伝子及びマイクロサテライト [MICB, MICA, HLA-B, HLA-C, HLA-A, MIB (Grimaldi, M.C. et al. (1996) Hum. Immunol., 51, 89-94) 及び D6S265 (Weissenbach, J. et al. (1992) Nature, 29, 794-801)] との併用により、情報量に富む MS 遺伝多型マーカーが計 45 個、すなわち 41.1kb に 1 つの割合で HLA クラス I 領域内に定められた。この高密度多型マーカーにより、尋常性乾癬の HLA クラス

I関連疾患のハプロタイプ分析、及びマッピング分析に関する正確な情報が得られると考えられる。

【0121】

〔実施例3〕 尋常性乾癬に関連する感受性遺伝子座の特定（2）

次に、HLAクラスI領域内における尋常性乾癬の原因遺伝子の位置を特定するために、上記の38個の反復部位のうち11個について相関解析を行った。

この11個のマイクロサテライトは、第6染色体のHLA-C遺伝子座の周囲にほぼ100kb当たりマイクロサテライト1個という分解能で密に分布するように選択した。

【0122】

相関解析は、実施例1に示した尋常性乾癬患者群と健常対照群とを対象とした。患者群は男性51例、女性25例からなり、平均発症年齢は33歳であった(SD=15.3)。

また、これら11個の遺伝多型マイクロサテライト座の反復単位数(マイクロサテライトアレルの遺伝子型)の位置を判定するために、前記MS遺伝多型マーカ含有DNA配列から、長さ20～28塩基のフォワードプライマー及びリバースプライマーを合成した。なお、この合成において、蛍光試薬6-FAM、HEX又はTET(PE Biosystems社(現Applied Biosystems社), Foster City, CA)を用い該フォワードプライマーの5末端を標識した。該プライマー11組22個を表1に示した。

【0123】

【表 1】

表 1 相関解析に用いたマイクロサテライトマーカー

マイクロサテライト	位置	繰り返し単位	PCR プライマー
C1_2_4	Tel. (0kb)/MICB	(CA) 23	CA:AATAGCCATGAGAAGCTATGTGGGGAG
	Cen. (89kb)/MICA		TG:CTACCTCCTTGCCAAACTTGCTGTTTGTG
C1_4_1	Tel. (40kb)/MICA	(CAAA) 6	CAAA:CGAGAACAACGGCAGGACTG
	Ceb. (6kb)/HLA-B		TTTG:GACAGTCTCATTAGCGCTGAGG
C1_2_5	Tel. (62kb)/HLA_B	(CA) 4AA (CA) 20	CA:CAGTAGTAAGCCAGAAGCTATTAC
	Cen. (19kb)/HLA-C		TG:AAGTCAAGCATATCTGCCATTG
C1_4_3	Tel. (26kb)/HLA-C	(GGAA) 18	GGAA:TAGAAAACGCAATCTCGGCC
	Cen (71kb)/OTF3		TTCC:CTGGATTAACTGGAGACTC
C1_3_1	Tel. (27kb)/HLA-C	(TTG) 8	TTG:CAGTGACAAGCACCTGGCAC
	Cen. (691b)/OTF3		CAA:GCCAGATGTGGTGGCATGC
C1_2_6	Tel/(85kb)HLA-C	(TA) 17	TA:TGTTTCAGACCTCTTCCTGCC
	Cen. (11kb)/OTF3		AT:GACTAGCTCTTGACTACTTG
C1_3_2	Tel. (37kb)/OTF3	(TAA) 16	TAA:TAGGGATGGTCCCAAACGTG
	Cen. (7kb)/S		TTA:CCCGTGCAGGACTGATCTCC
C2_4_4	TeL (80kb)/S	(GAAA) 6AAAA (GAAA) 3	GAAA:GGCTTGACTTGAAACTCAGAGACC
			TTTC:TTATCTACTTATAGTCTATCACGG
C4_2_12	Tel. (75kb)/DDR	(CA) 13	CA:GAGCCACGGAGAGTCTCCCTTTATC
	Cen. (89kb)/TUBB		TG:TCCAGGAACGTGAGTAGTAAGAAC
C4_2_25	Tel. (69kb)TUBB	(TG) 16	TG:TCTTCTGTGCAAGCAATGCACTGTAC
	Cen. (47kb)/HSGT260		CA:ATGTTACTTTTAGAAGATAACACTC
C3_2_11	Tel (50kb)/HLA-E	(GA) 22TA (CA) 8	GA:AGATGGCATTGGAGAGTGCAG
	Cen. (21kb)/MICC		TC:TCCTTACAGCAGAGATATGTGG

【0 1 2 4】

ここで、選択した 11 個のマイクロサテライト遺伝多型マーカーと、その PCR プライマーの配列番号を列記する。左側の番号がフォワードプライマーの配列番号、右側の番号がリバースプライマーの配列番号である。

C1-2-A; 配列番号 27089 : 配列番号 27090

G1-4-1; 配列番号 27091 : 配列番号 27092

C1-2-5; 配列番号 27093 : 配列番号 27094

C1-4-3; 配列番号 27095 : 配列番号 27096

C1_3_1; 配列番号 27097 : 配列番号 27098

C1_2_6; 配列番号 27099 : 配列番号 27100

C1_3_2; 配列番号 2 7 1 0 1 : 配列番号 2 7 1 0 2
C2_4_4; 配列番号 2 7 1 0 3 : 配列番号 2 7 1 0 4
C4_2_12; 配列番号 2 7 1 0 5 : 配列番号 2 7 1 0 6
C4_2_25; 配列番号 2 7 1 0 7 : 配列番号 2 7 1 0 8
C3_2_11; 配列番号 2 7 1 0 9 : 配列番号 2 7 1 1 0

【 0 1 2 5 】

PCR反応混合物は、ゲノムDNA 50ng、dNTP(各2.5mM)2 μ l - 10 \times バッファー(100 mM Tris HCl、pH8.3、500mM KCl、15mM MgCl₂)2 μ l、並びにフォワードプライマー及びリバースプライマーを20pmol、さらにタカラ組換えTaqポリメラーゼ(宝酒造、京都、日本)0.5Uを計20 μ l中に含むように調製した。96℃で5分間にわたり初期変性を行った後、自動サーマルサイクラー(宝酒造)を用いて、96℃ 1分間、55℃ 30秒間及び72℃ 45秒間からなる処理を30サイクル行い、72℃で4分間の最終伸長を行った。増幅産物を100℃で5分間変性させ、ホルムアミドを含む停止バッファーと混合した上でGS500 Tamra(PE Biosystemss社)のサイズ標準マーカとともに各レーンの開始位置に載せ、自動DNAシーケンサー中において、尿素を含む4%ポリアクリルアミド変性シーケンシングゲルを用いて分離した。断片サイズはGenescanソフトウェア(PE Biosystems社)を用いて自動判定した。

【 0 1 2 6 】

MS遺伝多型マーカは、動原体側からテロメア側に向かって次の順である：C1_2_A, C1_4_1, C1_2_5, C1_4_3, C1_3_1, C1_2_6, C1_3_2, C2_4_4, C4_2_12, C4_2_25 及びC3_2_11 (図1)。反復単位は、本発明者らによって決定された配列データから決定した(Shiina、T. et al.(1999) Immunol.Rev.,167,193-199)。MS遺伝多型マーカは、すべてTamiyaら(Tamiya,G. et al.(1998) Tissue Antigens, 51,337-346; Tamiya,G. et al. (1999) Tissue Antigens 54:221-228)によって樹立された。

【 0 1 2 7 】

Telはテロメア側、Cenは動原体側を表す。PCRプライマーの配列は、上から順に配列番号:2 7 0 8 9から2 7 1 1 0とした。

アレル頻度は直接計数によって評価した。患者群と対照群との間のアレル分布

の有意性の検定は、連続性の補正を行う χ^2 法、及びフィッシャーの正確確率検定(P値検定)によって行った。P値は各座位で観測されたマイクロサテライトアレルの数を乗することによって補正した(P_c)。 $P_c < 0.05$ の水準を統計的に有意とみなした。尋常性乾癬のリスクに関するオッズ比は2×2分割表から算出した。複数のアレルに関するハーディーワインベルグ比率の正確確率検定(exact P-value test)は、Genepopソフトウェアパッケージ中にあるマルコフ連鎖法によってシミュレートした(Tamiya, G. et al. (1998) Tissue Antigens, 51, 337-346; Tamiya, G. et al. (1999) Tissue Antigens 54: 221-228; Guo, S.W. and Thompson, E. A. (1992) Biometrics, 48, 361-372)。マルコフ連鎖法には、アレル数や標本数が少ない場合に、ハーディーワインベルグ比率を検定するための完全な算出を行うことができるという利点がある。アレル数が < 5 の場合には完全算出法によって正確確率(exact P-value)を算出した。ハーディーワインベルグ平衡検定に関しては $P < 0.1$ の水準を統計的に有意とみなした。

【 0 1 2 8 】

患者群におけるHLA-Cw6の表現型頻度(76例中8例、10.5%)は有意に高く、 P_c 値は0.02であった(オッズ比=15.88)。表2に示した通り、 P_c 値に対して < 0.05 の統計的有意差が患者群で認められたアレルは以下の4つのマイクロサテライト座で見いだされた:C1_2_6のアレル303($\chi^2=12.62$ 、 $P_c=0.0015$)、C1_8_2のアレル357($\chi^2=7.91$ 、 $P_c=0.0034$)、C2_4_4のアレル255、259(それぞれ $\chi^2=9.53$ 、 $P_c=0.0012$ 及び $\chi^2=11.58$ 、 $P_c=0.0022$)、C4_2_12のアレル223($\chi^2=7.59$ 、 $P_c=0.036$)。各MS遺伝多型マーカにおけるアレルの命名は増幅断片のサイズ長に基づいて行った。最も有意な相関が認められたのはC1_2_6のアレル303であった。C1_2_6からC4_2_12までの区域にある4つのマイクロサテライトではいずれも、患者群と対照群との間でアレル頻度に統計的有意差が認められた(表2及び図1)。

【 0 1 2 9 】

【表 2】

表 2 尋常性乾癬と相関する統計的に有意な アレル

座位	HLA-C からの距離 ^a	アレル数	アレル	オッズ比	オッズ比の CI	χ^2	P 値 ^b	Pc 値 ^c
C1_2_A	232kb (c)	10	242	0.44	0.24-0.81	6.97	0.0059	0.059
C1_4_1	91kb (c)	5	221	0.59	0.31-1.11	2.66	0.069	0.345
C1_2_5	19kb (c)	14	216	2.58	1.59-5.08	7.54	0.0057	0.0798
C1_4_3	29kb (t)	17	467	0.16	0.04-0.59	7.52	0.0037	0.0629
C1_3_1	31kb (t)	4	291	0.49	0.27-0.89	5.57	0.013	0.052
C1_2_6	89kb (t)	8	303	0.21	0.09-0.5	12.62	0.00019	0.00152
C1_3_2	143kb (t)	8	357	2.37	1.3-4.32	7.91	0.0042	0.0336
C2_4_4	200kb (t)	6	255	2.76	1.45-5.25	9.53	0.002	0.012
C2_4_4			259	0.24	0.11-0.55	11.58	0.00037	0.00222
C4_2_12	457kb (t)	9	223	0.33	0.73-0.15	7.59	0.004	0.036
C4_2_25	618kb (t)	7	271	5.06	0.56-45.1	2.11	0.2	1
C3_2_11	831kb (t)	17	209	0.55	0.26-1.17	2.43	0.082	1

【0130】

- a) (c) HLA-C遺伝子の動原体側 (t) HLA-C遺伝子のテロメア側
b) フィッシャーの正確確率検定による判定
c) 各遺伝子座におけるマイクロサテライトアレルの数を乗じることにより補正

した。統計的に有意とみなした0.05未満のPc値に下線を施した。

ハーディーワインベルグ比率からの偏差(確率検定)、及びハーディーワインベルグ平衡の帰無仮説に対するヘテロ接合体減少(Raymond, M. and Rousset, F. (1995) J. Hered., 86, 248-249; Rousset, F. and Raymond, M. (1995) Genetics, 140, 1413-1419)に関するマルコフ連鎖法(Guo, S. W. and Thompson, E.A. (1992) Biometrics, 48, 361-372)により、前記11種のMS遺伝多型マーカに関するハーディーワインベルグ比率の正確確率検定も行った。予想した通り、検討した11種のMS遺伝多型マーカはすべて、健常対照ではハーディーワインベルグ平衡に従った($P > 0.25$)。これに対して患者群では、表3に一覧を示した通り、5つの座位でハーディーワインベルグ平衡からの有意な偏差が認められた($P < 0.1$; C1_2_5、C1_3_1、C1_2_6、C1_3_2及びC2_4_4)。さらに、5つの座位ではヘテロ接合体の有意な減少が認められた($P < 0.1$; C1_4_3、C1_4_3、C1_3_2、C2_4_4、及びC4_2_12)。これに対して、ヘテロ接合体の増加はいずれのMS遺伝多型マーカにも認められなかった。C1_3_1からC2_4_4までの区域にある3つのマイクロサテライト座(C1_3_1、C1_3_2及びC2_4_4)で、確率検定、ヘテロ接合体減少検定ともに有意なP値が得られたことは注目に値する(表3及び図1)。特に、C1-3-2及びC2_4_4は、いずれの検定でも極めて有意なP値に達した。

【0131】

【表 3】

表 3 マイクロサテライトに関するハーディーワインベルグ比率の正確率検定

座位	HW ^a	SE	ヘテロ ^b	SE	ヘテロ期待値 ^c	ヘテロ観測値 ^d
C1_2_A	0.3939	0.0043	0.2881	0.0042	0.801	0.763
C1_4_1	0.2443	0.0016	0.7024	0.0019	0.633	0.613
C1_2_5	<u>0.0063</u>	0.0006	0.1599	0.0042	0.883	0.842
C1_4_3	0.1968	0.0065	<u>0.0362</u>	0.0028	0.89	0.829
C1_3_1	<u>0.0286</u>	-	<u>0.0203</u>	-	0.561	0.461
C1_2_6	<u>0.0889</u>	0.0023	0.1776	0.0027	0.676	0.579
C1_3_2	<u>0.0172</u>	0.0005	<u>0.0051</u>	0.0003	0.848	0.75
C2_4_4	<u>0.0097</u>	0.0004	<u>0.0093</u>	0.0003	0.655	0.553
C4_2_12	0.3006	0.0052	<u>0.0303</u>	0.0013	0.679	0.635
C4_2_25	0.666	0.0041	0.6684	0.007	0.466	0.481
C3_2_11	0.1837	0.0057	0.4787	0.0078	0.9	0.895

【0 1 3 2】

表中、正確確率(exact P-value)は、以下のパラメーターを用いるマルコフ連鎖法に基づくシミュレーションによって推定した：デメモライゼーション数 (d memorization number)=1000、パッチ数=400、パッチ1回当たりの反復数=8000。アレル数が<5の場合には完全算出法によって正確確率を算出した。統計的に有意とみなした0.1未満のP値に下線を施した。SE、標準誤差。

- a) ハーディーワインベルグ比率からの偏差(確率検定)
- b) ハーディーワインベルグ平衡の帰無仮説に対するヘテロ接合体減少
- c) 集団におけるヘテロ接合体頻度の期待値
- d) 患者集団におけるヘテロ接合体頻度の観測値

【0 1 3 3】

上記のように、解析したマイクロサテライトのうちC1_2_6からC4_2_12までの区域に位置する4つ(C1_2_6、C1_3_2、C2_4_4及びC4_2_12)で、患者群と対照群との間に統計的有意差が認められた(表2及び図1)。さらに、患者群でのハーディーワインベルグ平衡解析により、C1_3_1からC2_4_4までの区域にある3つのマイクロサテライト座(C1_3_1、C1_3_2及びC2_4_4)で、確率検定及びヘテロ接合体減

少検定の両方でハーディーワインベルグ平衡からの有意な偏差が認められた(表3及び図1)。特に、C1_3_2及びC2_4_4はいずれの検定とも極めて有意なP値に連した。

【0134】

乾癬の遺伝様式は不明であるが、表2から明らかなように、該5つのマイクロサテライト座でのヘテロ接合体の頻度が患者で期待される頻度より低かつたことは、本症が遺伝的浸透率は高くないものの、劣性HLA形質であることを示唆する。以上を総括すると、C1_2_6(HLA-Gの89kbテロメア側)からC2_4_4(HLA-Cの200kbテロメア側)までの111kbの区域が、アレル分布及びハーディーワインベルグ平衡からの偏差の関する統計的手法のいずれによる評価でも、>95%の信頼水準で尋常性乾癬に関して重要な共通領域であると結論された(図1)。

【0135】

患者群及び対照群のデータを取り扱う前者、患者群のデータのみを取り扱う後者という2つの独立した統計的手法のいずれによっても、尋常性乾癬に関して、ほぼ同一の重要な区域が判明したことは強調する必要がある。この結果は、患者におけるHLAクラスI(HLA-A、-B及び-C)及びクラスII(HLA-DRB1及び-DQB1)アレルを用いた伝達/不平衡テスト(transmission /disequilibrium test; TDT)及びパラメトリック連鎖解析に基づき、尋常性乾癬に関する感受性遺伝子がHLA-C遺伝子のテロメア側に存在することを示した以前のマッピングデータとも一致する(Jenisch, S. et al. (1998) Am. J. Hum. Genet., 63, 191-199)。

【0136】

〔実施例4〕 慢性リウマチの感受性遺伝子の解析 (1)

遺伝的要因の関与が強く示唆されている、慢性関節リウマチの感受性遺伝子を同定する第一段階として、ゲノムワイドに遺伝的相関解析を行った。慢性関節リウマチにおける遺伝的相関解析は、患者・健常者の年齢及び性別に関するサンプル構造を考慮したうえでプール化 DNA試料の調整を行った。実験開始時に収集済みであった、慢性関節リウマチ患者からの試料における性比は男性0.212、女性0.788であった。2回のスクリーニングを行うために、性比を上記に合わせて、2プール化DNA試料(125個体×2)を調製した。この時の年齢度数分布を10歳階級

にて示す（図2）。また、対照とする健常者群の試料プールの平均年齢は以下の通りである。

【0137】

<男性> 年齢平均： 44.3 SD： 11.8 サンプル数： 52

<女性> 年齢平均： 39.1 SD： 12.9 サンプル数： 198

患者集団の発症年齢に関しては情報がないため、参考文献を参照した。年齢度数分布を調査し（平均年齢は不明のため45歳とした。）、これに準じて健常者群のプール化DNA試料を調製した。

【0138】

患者群及び健常者群のプール化DNA試料を、実施例1に記載したように、ゲノムワイドのMS遺伝多型マーカーに対応するプライマー群を使用してスクリーニングに着手し、まず、1番及び4番染色体（2,471マーカー）について解析を行った。なお、1番染色体で用いたMS遺伝多型マーカーの57%、4番染色体で用いた該マーカーの59%は、該マーカー間スペーシングは100kb以下であった。1次スクリーニングの結果を図3に示す。今回、 $2 \times m$ の分割表を使用した χ^2 検定と $2 \times m$ 及び 2×2 の分割表を使用したFisherの直接確率検定により、相関のあるMS遺伝多型マーカーを選択した。 $2 \times m$ と 2×2 の分割表を用いた結果を比較した際には、相関を示すマーカーの数に違いが見られた。 2×2 の分割表による検定では、観察されたアレル数が多いマーカーにおいても、一つ一つのアレルに関して患者と健常者の間で差異を検出することが可能である。

【0139】

よって、特定のアレルと感受性遺伝子が連鎖不平衡を示す場合には、 2×2 の分割表を用いた検定によって検出することが可能となる。一方、 $2 \times m$ の分割表を用いた検定では、患者と健常者との間で全体的にアレル頻度に差がある場合において、取り逃すことなく検出することが可能となる。このような統計量の特色を踏まえて、2次スクリーニングのためのMS遺伝多型マーカーの選択を行った。

2次スクリーニングでは1次スクリーニングの結果陽性であった、102マーカーについて解析を行った。1次スクリーニングの際に使用したDNA試料群とは重複しない、別の試料群により2次スクリーニング用プール化DNA試料の調製を行い、実験

を行った。

【0140】

このような段階的な解析により、統計的な閾値について補正を入れることなく、偽陽性を効果的に減らすことが可能となると期待される。Barcellosら（1997）の報告をもとにすると、ゲノムワイドの遺伝多型マーカーを用いて1次スクリーニングを行う場合、陽性として得られるMS遺伝多型マーカー数は1,500マーカーの偽陽性（全マーカーのうちの5%）と、いくつかの真の陽性マーカーを合わせた数としての検出が予想される。同様に2次スクリーニングを行うことによって、偽陽性の数を75（1,500のさらに5%）まで絞り込むことが可能となる5）。以降、Individual typingによる確認や別患者集団のサンプルを用いたTDT解析等により、さらに偽陽性を減らして真の感受性遺伝子の同定に近づくことが可能である。

【0141】

実際に2次スクリーニングとして102マーカーについて解析を行ったところ、16マーカーが陽性として得られた。1番染色体についてはCornelisら（1998）がEuropean Caucasianの114組の罹患同胞対を対象に行った連鎖解析について報告している20）。彼等は、D1S228（1p36-pter）において有意な連鎖領域を見出している。また、Shiozawaら（1998）は日本人41家系を対象に罹患同胞対解析を行った結果、1p36にmaximal lod score (MLS)が3以上の有意な連鎖を報告している21）。また、Jawaheerら（2001）はNorth American Rheumatoid Arthritis Consortiumの257家系を対象に罹患同胞対解析を行った結果、D1S235（1q43-44）に有意な連鎖を報告している22）。一方、4番染色体はJawaheerら（2001）によりD4S1647（4q23-24）に有意な連鎖を報告している22）。今回の我々の結果では、これら既報のバンド領域にいくつかの陽性を示すMS遺伝多型マーカーが観察された。

【0142】

【発明の効果】

本発明の方法により、設定されたマイクロサテライト遺伝多型マーカー含有DNA配列群（配列番号1より配列番号27088）が人種を越えて、その遺伝多型性を有する点において、95%以上の割合で共有していることから、人種を限定せず、効果的にゲノムワイド遺伝的相関解析を行うことが可能となった。例えば、

実施例で示したように慢性関節リウマチについて、1番、4番染色体の（2471マーカ）について解析を行い、1次スクリーニングの結果102マーカが陽性であったので、2次スクリーニングを行ったところ、16マーカー（1番染色体6マーカー、4番染色体10マーカー）が陽性として得られた。感受性遺伝子の候補領域をこのように限定できたので、これらの領域についてSNP解析を行い、感受性遺伝子を特定することが可能になった。また、ゲノムワイルド（配列番号1から配列番号27088）のマイクロサテライト遺伝多型マーカ含有DNA配列群を適用できるだけでなく、疾患等の表現型に係わる特定の染色体のみについて、配列番号1から配列27088の一部を用いて詳細な解析を行い、より高速で、より精度高くし、該疾患感受性領域に存在する遺伝子を特定することが可能となった。

【0143】

さらに、本発明の方法により特定されて単離される遺伝子、該遺伝子がコードする蛋白質、該蛋白質に対する抗体、及び／又は該遺伝子の一方の鎖又はその相補鎖に相補的な少なくとも15ヌクレオチドを含むポリヌクレオチドは、遺伝子検査や遺伝子治療などに利用され得る。また本発明の方法により単離される疾患原因遺伝子、該遺伝子がコードする蛋白質、該蛋白質に対する抗体、及び／又は該遺伝子の一方の鎖又はその相補鎖の少なくとも15ヌクレオチドを含むポリヌクレオチドは、該疾患の検査、予防、及び／又は治療のために用いることができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、相関検定およびハーディーワインベルグ比率の正確確率検定によって得られたP値を、尋常性乾癬の遺伝子マッピングに用いたマイクロサテライトマーカの位置とともに示した図である。

【図2】

図2は、慢性関節リウマチに対する1次スクリーニングの1番染色体における結果を示す図である。

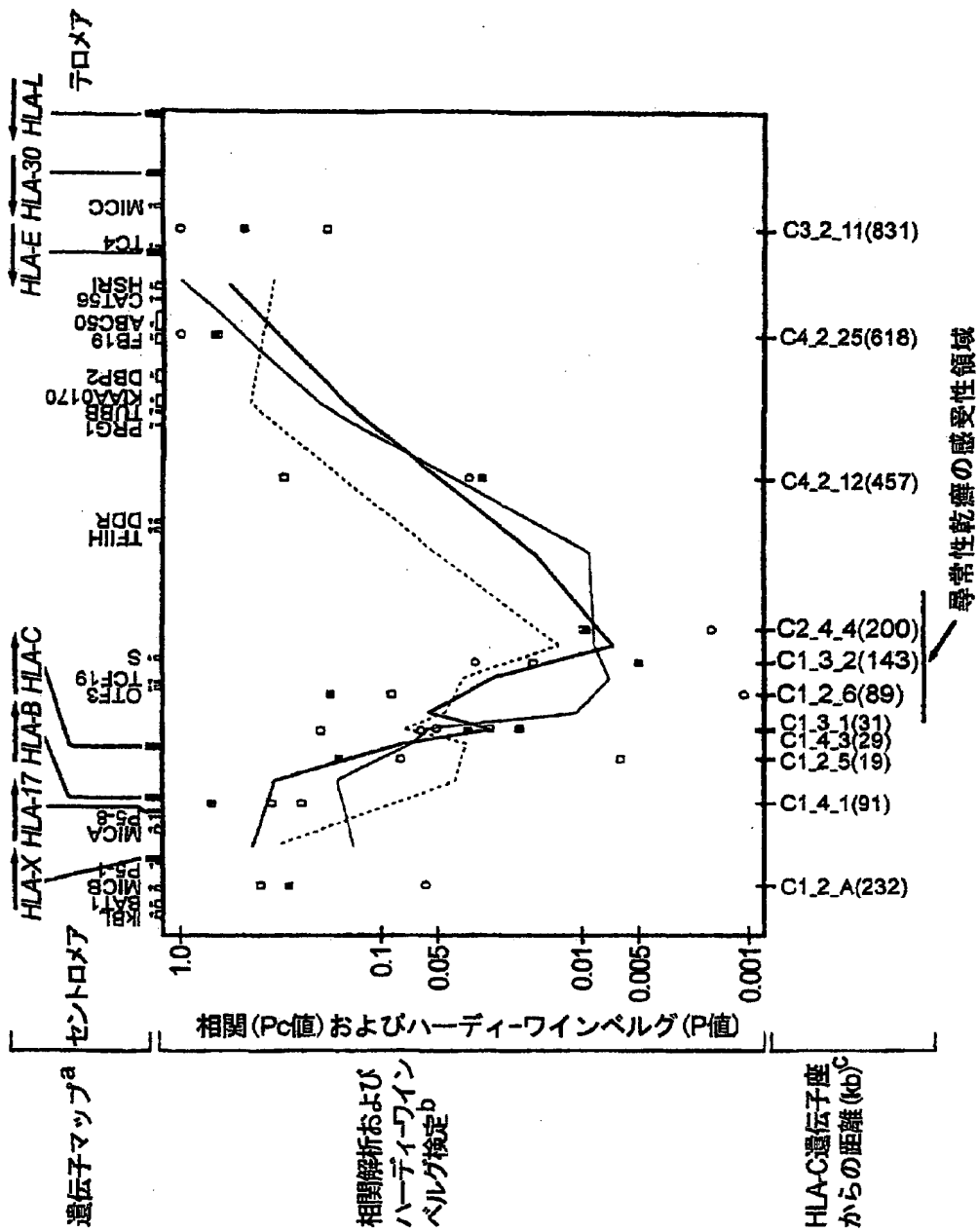
【図3】

図3は、慢性関節リウマチに対する1次スクリーニングの4番染色体における結果を示す図である。

【配列表】

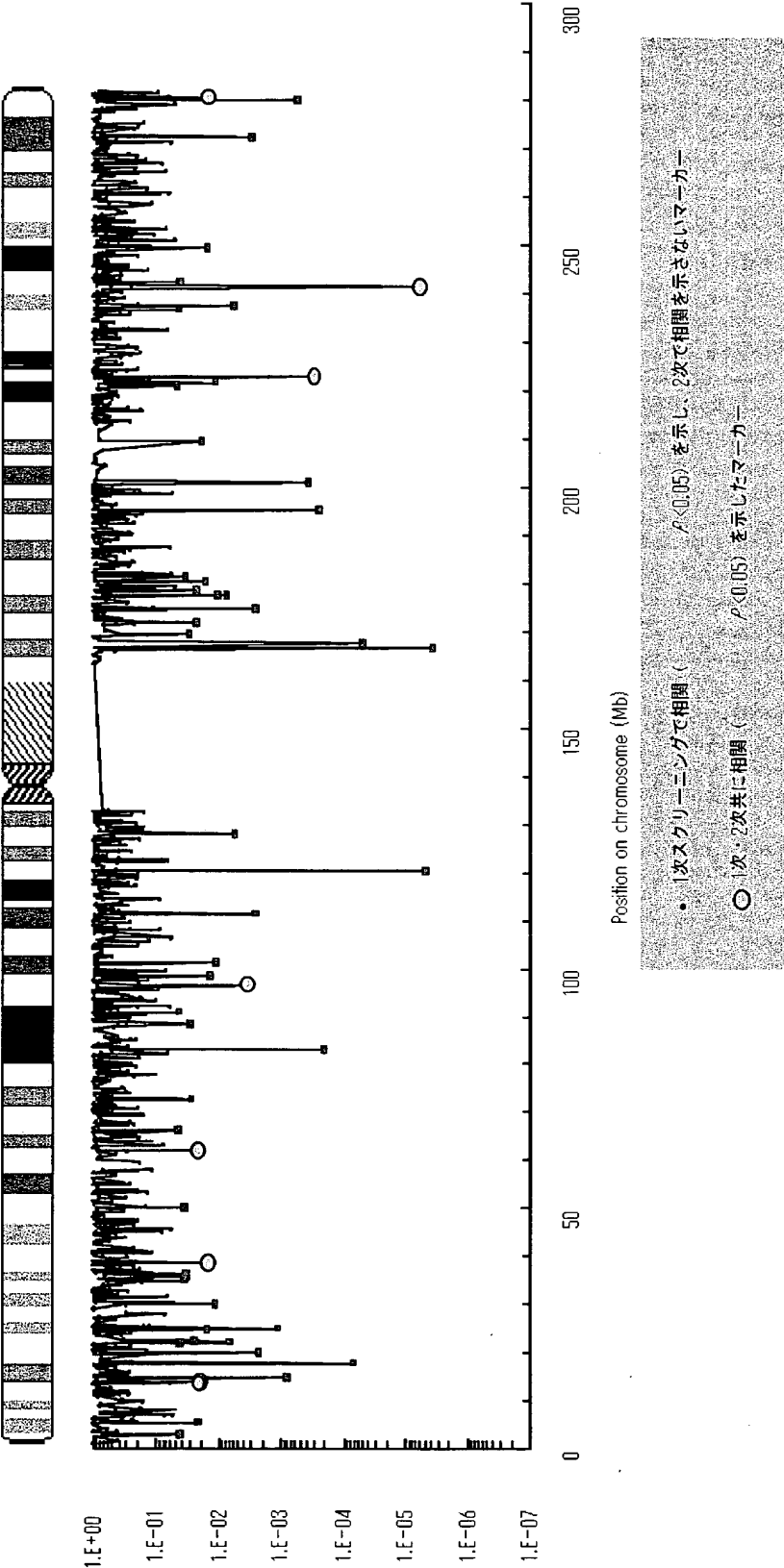
【書類名】 図面

【図 1】



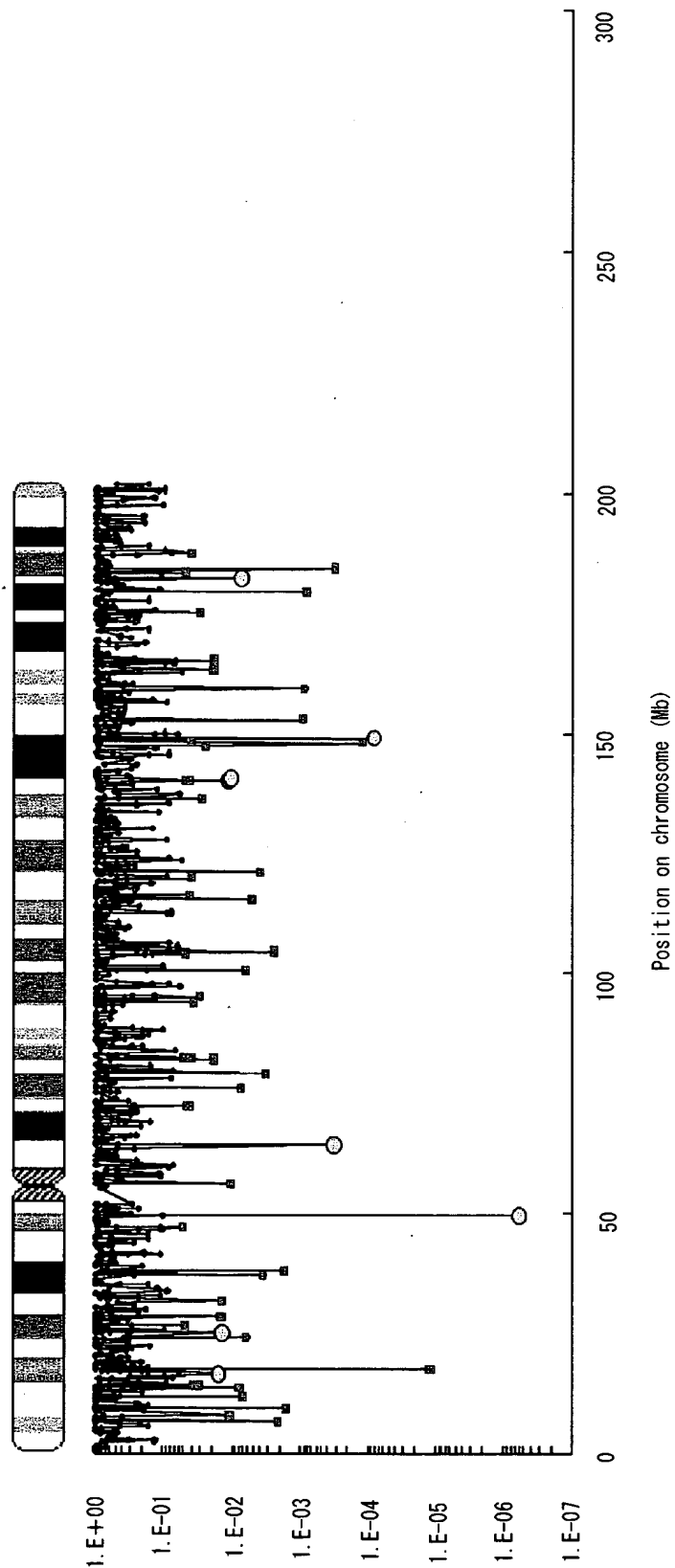
【図 2】

図 2



【図 3】

図 3



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 マイクロサテライト遺伝多型マーカを用いる遺伝子のマッピング方法を提供する。

【解決手段】 ヒトゲノム上に、所定の間隔で設定されたマイクロサテライト遺伝多型マーカ含有DNA配列群の各DNA配列に対応するプライマーを用い、得られたDNA配列試料でポリメラーゼ連鎖反応を行ない、マイクロサテライト遺伝多型マーカ含有DNA配列断片群を得る工程を有する遺伝子のマッピング方法。

【効果】 本発明の方法により、人種に制限されず、効果的にゲノムワイド遺伝的相関解析を行うことが可能となった。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 2 - 3 2 7 5 1 6

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[5 9 9 1 7 1 2 3 5]

1. 変更年月日
[変更理由]

1 9 9 9 年 1 2 月 6 日
新規登録

住 所
氏 名

神奈川県厚木市船子 1 5 8 3 - 1 - 1 0 1
猪子 英俊

2. 変更年月日
[変更理由]

2 0 0 2 年 1 2 月 2 日
住所変更

住 所
氏 名

神奈川県横浜市泉区緑園一丁目 1 9 番地 3 5
猪子 英俊

特願 2002-327516

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000125369]

1. 変更年月日

1990年 8月27日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都渋谷区富ヶ谷2丁目28番4号

氏 名

学校法人東海大学